

Von Protonenturbinen zu Respirasomen: Isolierung und strukturelle Charakterisierung energieumwandelnder Membranproteine



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach

Biochemie
genehmigte

kumulative
Habilitationsschrift

von

Dr.-Ing. Holger Seelert

aus Westerholt/Herten

Datum der Einreichung: 22.06.2010

Datum des Habilitationsvortrags: 18.04.2011

Darmstadt 2011

D17



Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iii
Verwendete Abkürzungen	iv
Danksagung	v
Eigene Publikationen	vi
I Struktur und Funktion energieumwandelnder Proteinkomplexe	1
Gliederung	2
1 Zusammenfassung	3
2 Forschungsprojekte	4
3 Einleitung	5
3.1 Biologische Membranen	5
3.2 Organisation von Proteinkomplexen	6
3.3 Isolierung von Membranproteinen	7
3.3.1 Solubilisierung	7
3.3.2 Reinigung von solubilisierten Membranproteinen	9
3.4 Strukturaufklärung von Membranproteinen	10
3.5 Energieumwandelnde Membranproteine	14
3.5.1 Die ATP-Synthase	15
3.5.2 Superkomplexe von energieumwandelnden Membranproteinen	19
4 Ergebnisse der eigenen Untersuchungen	26
4.1 Isolierung und Reinigung von Membranproteinkomplexen	26
4.1.1 Isolierung von Proteinkomplexen mittels präparativer Gelelektrophorese	26
4.1.2 Isolierung der ATP-Synthase aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	29
4.1.3 Isolierung der ATP-Synthase aus <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	31
4.1.4 Isolierung von Subkomplexen der ATP-Synthase aus Spinat	34
4.1.5 Eigene Arbeiten zum Themengebiet	37
4.2 Struktur und Funktion von ATP-Synthasen	38
4.2.1 Aufbau und enzymatische Aktivität der Chloroplasten-ATP-Synthase	38
4.2.2 Stöchiometrie des Oligomers der Untereinheit c/III	39
4.2.3 Supramolekulare Organisation der ATP-Synthase	44
4.2.4 Eigene Arbeiten zum Themengebiet	47
4.3 Supramolekulare Architektur der mitochondrialen Atmungskette	48
4.3.1 Die mitochondriale Atmungskette von Pflanzen	48
4.3.2 Struktur und Aktivität von Superkomplexen der mitochondrialen Atmungskette . .	49
4.3.3 Eigene Arbeiten zum Themengebiet	51

5 Ausblick	52
Literaturverzeichnis	53
 II Kumulativer Teil	 73
A Eigene Publikationen	74
A.1 Farbstoff-Entfernung, katalytische Aktivität und 2D-Kristallisation	74
A.2 Protonen-getriebene Turbine eines Pflanzen-Motors	75
A.3 ATP-Synthase: eingeschränkte Stöchiometrie	76
A.4 Charakterisierung der Untereinheit III und ihres Oligomers	77
A.5 Die Thylakoidmembran bei verändertem metabolischem Zustand	78
A.6 14 Protomere bilden das Oligomer III der Chloroplasten-ATP-Synthase	79
A.7 Stöchiometrie des Oligomers III wird nicht durch den metabolischen Zustand beeinflusst .	80
A.8 Dimere der ATP-Synthase in Chloroplasten	81
A.9 Respirasom-ähnliche Superkomplexe in Spinat-Mitochondrien	82
A.10 Architektur aktiver Atmungsketten-Superkomplexe	83
A.11 Unterschiede der Untereinheiten des peripheren Stiels der Chloroplasten-ATP-Synthase . .	84
A.12 Wechselwirkungen der Rotor-Untereinheiten in der ATP-Synthase	85
A.13 Metabolismus regulierte Dimerisierung der Chloroplasten-ATP-Synthase	86
A.14 Detektion und Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen	87
A.15 Stabilität der ATP-Synthase thermophilen Cyanobakterien	88
A.16 Präparative Isolierung von Proteinkomplexen durch Elution aus Polyacrylamidgelen	89
A.17 Von Protonen zu OXPHOS-Superkomplexen und der Alzheimer-Erkrankung	90
A.18 Hochsensitive Detektion der ATPase-Aktivität in nativen Gelen	91
 Eidesstattliche Erklärung	 93

Abbildungsverzeichnis

3.1	Schematische Darstellung einer biologischen Membran	5
3.2	Solubilisierung von Membranproteinkomplexen	8
3.3	Strukturformeln nicht-ionischer Detergenzien	8
3.4	Methoden zur Reinigung von Proteinen.	10
3.5	2D-Kristallisation.	12
3.6	Schema der mitochondrialen Atmungskette	14
3.7	Aufbau der ATP-Synthase	15
3.8	Untereinheiten der Chloroplasten-ATP-Synthase	16
3.9	Superkomplexe der mitochondrialen Atmungskette	20
4.1	Elektrophorese von Protein(komplex)en	27
4.2	Blau-native Elektrophorese zur Isolierung von CF _O	28
4.3	Reinigung der ATP-Synthase aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mittels Chromatographie . . .	29
4.4	Reinigung der ATP-Synthase aus <i>C. reinhardtii</i> mittels präparativer Gelelektrophorese . . .	30
4.5	Reinigung der ATP-Synthase aus <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	32
4.6	Analyse zur Reinigung der ATP-Synthase aus <i>T. elongatus</i>	33
4.7	Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolierung von III ₁₄	35
4.8	Isolierung von CF _O über Chromatographie	36
4.9	AFM-Bilder zur 2D-Kristallisation	40
4.10	AFM und EM von <i>T. elongatus</i>	43
4.11	Dimere der Chloroplasten-ATP-Synthase	45
4.12	Mitochondriale Atmungskette von Pflanzen	48

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ADP	Adenosin-Diphosphat
AFM	Raster-Kraft-Mikroskopie (engl. atomic force microscopy)
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BN	blau-nativ
CBBG	Coomassie Brilliant Blau G-250
CD	Circulardichroismus
CF ₁	hydrophiler Subkomplex der Chloroplasten-ATP-Synthase
CF ₁ F ₀	Chloroplasten-ATP-Synthase
CF ₀	membranintegroaler Subkomplex der Chloroplasten-ATP-Synthase
cmc	Kritische Mizellbildungskonzentration (engl. critical micelle concentration)
CN	farblos-nativ (engl. colorless native)
DCCD	Dicyclohexyl-Carbodiimid
$\Delta\Psi$	Membranpotential
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
F ₁	hydrophiler Subkomplex der ATP-Synthase
F ₁ F ₀	ATP-Synthase
F ₀	membranintegroaler Subkomplex der ATP-Synthase
FTIR	Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie
HR	hochauflösend (engl. high resolution)
Komplex I	NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase
Komplex III	Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Cytochrom-bc ₁ -Komplex)
Komplex IV	Cytochrom-c-Oxidase
Komplex V	ATP-Synthase
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisierung
MF ₁	hydrophiler Subkomplex der mitochondrialen ATP-Synthase
MF ₁ F ₀	Mitochondriale ATP-Synthase
MF ₀	membranintegroaler Subkomplex der mitochondrialen ATP-Synthase
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance)
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Norbert A. Dencher für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Er hat mein Interesse an der ATP-Synthase und anderen Membranproteinen geweckt und mich in spannende Forschungsprojekte eingebunden. Über die Jahre hinweg hat er mich gefördert und hilfreiche Kontakte zu anderen Wissenschaftlern hergestellt. Beim Verfassen der Publikationen und beim Vorbereiten von Projektanträgen gab er mir wertvolle Anregungen.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich mich für die langjährige Förderung im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 472 - Molekulare Bioenergetik bedanken.

Für die Förderung des aktuell gestarteten Projekts GerontoMitoSys gilt mein Dank dem Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Prof. Dr. Daniel J. Müller (BIOTEC, Dresden) und seiner Arbeitsgruppe (vor allem Jinshu Yu und Adriana L. Klyszejko) danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Raster-Kraft-Mikroskopie von 2D-Kristallen.

Bei Prof. Dr. Werner Kühlbrandt (MPI für Biophysik) möchte ich mich bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die umfangreichen elektronenmikroskopischen Untersuchungen in seinen Labors durchzuführen. Auch die Diskussionen mit ihm über die 2D-Kristallisation waren sehr wichtig zur Optimierung der Proben. Bei der praktischen Durchführung der Elektronenmikroskopie gilt Deryck J. Mills besonderer Dank, der mich in die Benutzung der Mikroskope einführte, sie hervorragend einstellte und bei Problemen immer gute Vorschläge hatte. Außerdem danke ich Dr. Janet Vonck für die Kryoelektronenmikroskopie der 2D-Kristalle und die guten Ratschläge zur Kristallisation. Bei Dr. Thomas Meier möchte ich mich für die Bereitstellung der Oligomere aus *Ilyobacter tartaricus* und *Spirulina platensis* bedanken, die sehr hilfreich für die Bestimmung unbekannter Oligomer-Stöchiometrien waren.

Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Prof. Dr. Joachim Heberle (Freie Universität Berlin) und Dr. Henning Stahlberg (C-CINA, Biozentrum Basel). Mit J. Heberle zusammen wurden die Infrarotspektren gemessen, mit H. Stahlberg die AFM-Bilder ausgewertet.

Dr. Ansgar Poetsch (Ruhr-Universität Bochum) danke ich für seine Freundschaft und die hervorragenden gemeinsamen Projekte, wie beispielsweise die Charakterisierung der ATP-Synthase aus *Thermosynechococcus elongatus*.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Dencher danke ich für das angenehme Arbeitsklima und interessante Diskussionen. Nicolas G. Heidrich, Jürgen M.W. Meyer zu Tittingdorf, Nicole H. Reifschneider, Sascha Rexroth, Eva Schäfer, Helena J. Schwaßmann und Tina Suhai haben im Rahmen ihrer Doktorarbeiten engagiert an den unterschiedlichen Projekten mitgearbeitet und wertvolle experimentelle Ergebnisse beigesteuert. Außerdem vielen Dank an Jennifer Braun, Elvir Ramić, Maria Saager, Stefan Schmelz, Tetyana Syzonenko und Andrea Ulrich für ihre Beiträge im Rahmen der Diplomarbeiten, ebenso vielen Dank an die von mir betreuten Praktikanten und Bachelorstudenten. Für die Organisation der Abläufe im Labor und Verwaltung gilt mein Dank Michaela Fröhlich, Christine Schröpfer, Elizabeth Trapp und Gerda Zeising.

Meiner Frau Kathleen danke ich, dass sie immer Verständnis für meine Arbeit aufbrachte (auch wenn sich manches in die Länge zog), zu mir stand und mich unterstützte.

Publikationen im Rahmen der Habilitation

1. Poetsch, A., D. Neff, H. Seelert, H. Schägger und N. A. Dencher (2000) Dye removal, catalytic activity and 2D crystallization of chloroplast H⁺-ATP synthase purified by blue native electrophoresis, *Biochim. Biophys. Acta* 1466: 339-349 (siehe Anhang A.1).
2. Seelert, H., A. Poetsch, N.A. Dencher, A. Engel, H. Stahlberg und D.J. Müller (2000) Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor, *Nature* 405: 418-419 (siehe Anhang A.2).
3. Müller, D.J., N.A. Dencher, T. Meier, P. Dimroth, K. Suda, H. Stahlberg, A. Engel, H. Seelert und U. Matthey (2001) ATP synthase: constrained stoichiometry of the transmembrane rotor, *FEBS Lett.* 504: 219-222 (siehe Anhang A.3).
4. Poetsch, A., S. Rexroth, J. Heberle, T.A. Link, N.A. Dencher und H. Seelert (2003) Characterisation of subunit III and its oligomer from spinach chloroplast ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1618: 59-66 (siehe Anhang A.4).
5. Rexroth, S., J. M. W. Meyer zu Tittingdorf, F. Krause, N. A. Dencher und H. Seelert (2003) Thylakoid membrane at altered metabolic state: Challenging the forgotten realms of the proteome, *Electrophoresis* 24: 2814-2823 (siehe Anhang A.5).
6. Seelert, H., N.A. Dencher und D.J. Müller (2003) Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase, *J. Mol. Biol.* 333: 337-344 (siehe Anhang A.6).
7. Meyer zu Tittingdorf, J. M. W., S. Rexroth, E. Schäfer, R. Schlichting, C. Giersch, N. A. Dencher und H. Seelert (2004) The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in *Chlamydomonas reinhardtii* is not affected by the metabolic state, *Biochim. Biophys. Acta* 1659: 92-99 (siehe Anhang A.7).
8. Rexroth, S., J.M. Meyer zu Tittingdorf, H.J. Schwaßmann, F. Krause, H. Seelert, und N.A. Dencher (2004) Dimeric H⁺-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta* 1658: 202-211 (siehe Anhang A.8).
9. Krause, F., N.H. Reifschneider, D. Vocke, H. Seelert, S. Rexroth, und N.A. Dencher (2004) "Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach, *J. Biol. Chem.* 279: 48369-48375 (siehe Anhang A.9).
10. Schäfer, E., H. Seelert, N.H. Reifschneider, F. Krause, N.A. Dencher und J. Vonck (2006) Architecture of Active Mammalian Respiratory Chain Supercomplexes, *J. Biol. Chem.* 281: 15370-15375 (siehe Anhang A.10).
11. Poetsch, A., R. J. Berzborn, J. Heberle, T. A. Link, N. A. Dencher und H. Seelert (2007) Biophysics and Bioinformatics Reveal Structural Differences of the Two Peripheral Stalk Subunits in Chloroplast ATP Synthase, *J. Biochem.* 141: 411-420 (siehe Anhang A.11).
12. Gertz, M., H. Seelert, N. A. Dencher und A. Poetsch (2007) Interactions of rotor subunits in the chloroplast ATP synthase modulated by nucleotides and by Mg²⁺, *Biochim. Biophys. Acta* 1774: 566-574 (siehe Anhang A.12).

-
13. Schwaßmann, H. J., S. Rexroth, H. Seelert und N. A. Dencher (2007) Metabolism controls dimerization of the chloroplast F_0F_1 ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*, FEBS Lett. 581, 1391-1396 (siehe Anhang A.13).
 14. Krause, F. und H. Seelert (2008) Detection and Analysis of Protein-Protein Interactions of Organelar and Prokaryotic Proteomes by Blue Native and Colorless Native Gel Electrophoresis, in Current Protocols in Protein Science (Hrsg.: Coligan, J. E., Dunn, B. M., Speicher, D. W. und Wingfield, P. T.) John Wiley and Sons, Inc., Supplement 51, UNIT 14.11: 1-36; wiederveröffentlicht als UNIT 19.18 (siehe Anhang A.14).
 15. Suhai, T., N. A. Dencher, A. Poetsch und H. Seelert (2008) Remarkable stability of the proton translocating F_1F_0 -ATP synthase from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, Biochim. Biophys. Acta 1778: 1131-1140 (siehe Anhang A.15).
 16. Seelert, H. und F. Krause (2008) Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels, Electrophoresis 29: 2617-2636 (siehe Anhang A.16).
 17. Seelert, H., D. N. Dani, S. Dante, T. Hauß, F. Krause, E. Schäfer, M. Frenzel, A. Poetsch, S. Rexroth, H. J. Schwaßmann, T. Suhai, J. Vonck, und N. A. Dencher (2009) From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes, Biochim. Biophys. Acta 1787: 657-671 (siehe Anhang A.17).
 18. Suhai, T., N. G. Heidrich, N. A. Dencher und H. Seelert (2009) Highly sensitive detection of ATPase activity in native gels, Electrophoresis 30: 3622-3625 (siehe Anhang A.18).



Teil I

Struktur und Funktion energieumwandelnder Proteinkomplexe

Gliederung der Habilitationsschrift

Diese Habilitationsschrift umfasst den Zeitraum vom Ende der praktischen Arbeiten zur Dissertation im Jahr 2000 bis zum Mai 2010. Zunächst wird eine Einführung in die bearbeiteten Themenbereiche gegeben, die die Entwicklung der für diese Arbeit wichtigen Methoden und Konzepte beschreibt. Anschließend werden die Ergebnisse der experimentellen Arbeiten thematisch zusammengefasst und im Vergleich zur aktuellen Literatur diskutiert. Als Ergänzung zu den Publikationen aus dem kumulativen Teil sind auch einige bislang nicht veröffentlichte Daten zur Erläuterung gezeigt. Im Anhang befinden sich die in Deutsch übersetzten Zusammenfassungen der während dieser Habilitation publizierten Manuskripte. Daran anschließend sind die Artikel beigefügt.

1 Zusammenfassung

Adenosintriphosphat (ATP) ist von zentraler Bedeutung für alle Lebewesen, da es als Energieträger dazu eingesetzt wird, eine Vielzahl an Prozessen zu realisieren wie Bewegungen, Informationsübermittlung oder Fortpflanzung. Die Biosynthese von ATP läuft an biologischen Membranen ab, indem Membranproteine einen elektrochemischen Ionengradienten (oft von Protonen) aufbauen, der anschließend von der ATP-Synthase genutzt wird. Um nun die Funktionsweise dieser energiewandelnden Proteinkomplexe zu verstehen, ist für viele Untersuchungsverfahren die Isolierung aus der biologischen Membran unter milden Bedingungen notwendig. Im Rahmen meiner Forschungsarbeit hat sich die Solubilisierung vor allem mit Dodecylmaltosid und Digitonin als sehr geeignet erwiesen, z.B. zur Isolierung der ATP-Synthase aus verschiedenen photosynthetischen Organismen. Nach chromatographischer Reinigung konnte erstmals eine hochreine ATP-Synthase aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* erhalten werden, die sich durch ihre hohe Stabilität auszeichnete. Neben der Stabilität war aber auch die Verfügbarkeit geeigneter Mengen von großer Bedeutung, was wiederum vor allem für die ATP-Synthase aus Spinat gegeben ist. Nur durch Probenmengen im Milligramm-Bereich ließen sich umfangreichen Testserien durchführen, wie sie zur Optimierung der 2D-Kristallisation erforderlich waren. Solche 2D-Kristalle wurden benötigt, um mittels Elektronen- und Raster-Kraft-Mikroskopie bislang unbekannte strukturelle Details über den membranintegralen Bereich der ATP-Synthase zu enthüllen. Ein wichtiger Durchbruch der strukturellen Untersuchungen war die Ermittlung der Anzahl an Protonen-transportierenden Untereinheiten in der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat. Diese Stöchiometrie ist für die Bioenergetik von elementarer Bedeutung, da dadurch die Effizienz der ATP-Synthase bestimmt wird. Die Ergebnisse konnten in *Nature* publiziert werden und sind bisher mehr als 245 mal zitiert. Außerdem ist durch meine Forschungsarbeiten eindeutig gezeigt worden, dass die Anzahl dieser Untereinheiten von der Form der Untereinheit abhängig ist, nicht aber – wie von anderen vermutet – von den Wachstumsbedingungen der Organismen.

Ein weiterer Themenkomplex meiner Forschung war die supramolekulare Organisation von Proteinkomplexen. So wurde angenommen, dass Dimere von ATP-Synthasen nur in Mitochondrien auftreten. Durch die Identifizierung des Dimers der Chloroplasten-ATP-Synthase konnte diese Vermutung widerlegt werden. Zusätzlich zeigten quantitative Bestimmungen, dass die Menge dieser Dimere in den Chloroplasten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* mit dem metabolischen Zustand korreliert ist. Für die Mitochondrien, vor allem aus Säugetieren, wurde postuliert, dass definierte Zusammenlagerungen der Atmungskettenkomplexe den effizienten Transport von Substraten zwischen den Komplexen I bis IV gewährleisten („Respirasom“). Die eigenen Befunde (über native Gelelektrophorese) legten erstmals dar, dass solche Strukturen auch in Pflanzen-Mitochondrien existieren. Darüber hinaus ließ sich nachweisen, dass Digitonin bei Spinat aus einer Chloroplasten/Mitochondrien-Mischung selektiv die Atmungskettenkomplexe solubilisiert, z.B. Superkomplexe mit der Zusammensetzung I_1III_2 und $I_1III_2IV_1$. Größere Mengen der Superkomplexe konnten aus Rinderherz-Mitochondrien isoliert werden, durch die Etablierung der präparativen nativen Gelelektrophorese. Erst nach Elution aus dem Gel waren die Superkomplexe für eine Strukturanalyse verwendbar. Hierbei ermöglichte die Auswertung elektronenmikroskopischer Bilder den ersten Einblick in den 3D-Aufbau von I_1III_2 und $I_1III_2IV_1$ und eine Lokalisierung des Komplexes IV im größeren Superkomplex. Dies war gleichzeitig der entscheidende Beweis, dass $I_1III_2IV_1$ der Hauptbaustein der mitochondrialen Atmungskette in Säugetieren ist, wodurch sich nun exakte Modelle für den Transfer von Substraten zwischen den Komplexen I, III und IV entwickeln lassen. Außerdem waren die beiden Strukturen von zentraler Bedeutung für die allgemeine Anerkennung der Existenz von Superkomplexen. Beim Superkomplex $I_1III_2IV_1$ zeigte sich auch der Vorteil dieser Art der Organisation, denn sie erhöht die Stabilität und enzymatische Aktivität.

2 Forschungsprojekte

Um einen Organismus mit dem zellulären Energieträger ATP zu versorgen, sind verschiedene energieumwandelnde Membranproteinkomplexe erforderlich. Sowohl bei der Atmungskette als auch bei der Photosynthese werden als Voraussetzung für die ATP-Herstellung Protonen über die jeweilige Membran transportiert. Anschließend nutzt die ATP-Synthase diesen elektrochemischen Protonengradienten und wandelt ihn zunächst in eine Rotationsbewegung von Proteinuntereinheiten um. Diese intramolekulare Drehbewegung bewirkt dann Konformationsänderungen, welche die ATP-Synthese energetisieren. Der Transport der Protonen erfolgt durch ein Oligomer identischer Untereinheiten c_x . In dieser Protonenturbine besitzt jedes einzelne Protein c genau eine Protonenbindestelle, so dass bei einer vollständigen Rotation des Oligomers die Anzahl an Protonen über die Membran befördert wird, die der Anzahl an c-Untereinheiten entspricht. Durch die Rotation des c_x -Oligomers um 360° werden drei Moleküle ATP synthetisiert, wodurch sich dann ein Verhältnis von $x \text{ H}^+ / 3 \text{ ATP}$ ergibt. Um also die Effizienz der biologischen Energieumwandlung von den Erzeugern des elektrochemischen Protonengradienten zur Produktion von ATP abschätzen zu können, ist es erforderlich die Stöchiometrie des Oligomers aufzuklären. Hierzu sollten neben der ATP-Synthase aus Spinat auch andere photosynthetische ATP-Synthasen isoliert werden (z.B. aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus*). Dabei mussten geeignete Reinigungsvorschriften ausgearbeitet werden, unter Nutzung klassischer Verfahren (Chromatographie, Zentrifugation) sowie Etablierung der präparativen nativen Gelelektrophorese. Durch die native Elektrophorese sollte außerdem die Organisation der energieumwandelnden Membranproteinkomplexe analysiert werden. So gibt es sowohl für die Photosysteme der Chloroplasten als auch für die mitochondrialen Atmungskettenkomplexe Berichte über eine definierte Assoziation zu sogenannten Superkomplexen. Eine wichtige Fragestellung hierbei war, ob neben den bekannten Dimeren der mitochondrialen ATP-Synthase ebenfalls Dimere der Chloroplasten-ATP-Synthase existieren. Des Weiteren ließ sich das Ausgangsmaterial aus Spinat und der Grünalge zur Isolierung pflanzlicher Mitochondrien nutzen. Mit diesen Proben können die Atmungskettenkomplexe I-IV sowie ihre Superkomplexe, die Respirasomen, analysiert werden. Dabei richtet sich ein Fokus auf die Ermittlung, in wie weit sich verschiedene Superkomplexe in ihrer Funktion und Struktur unterscheiden. Da im Labor auch Mitochondrien aus Rinderherz und Ratten zur Verfügung stehen, sollte ein Vergleich der supramolekularen Organisation in Tieren und Pflanzen vorgenommen werden. Außerdem kann durch Variation der Wachstumsbedingungen festgestellt werden, ob der metabolische Zustand diese Organisation beeinflusst. Schließlich ist auch die Auswirkung von Superkomplex-Strukturen auf die Membranstruktur zu diskutieren.

3 Einleitung

3.1 Biologische Membranen

Die Kompartimentierung, also die Abgrenzung von der Umgebung, stellt einen zentralen Aspekt der Entstehung bzw. zur Definition von Lebewesen dar [1, 2]. Erst die Bildung von biologischen Membranen schafft definierte Reaktionsräume und trennt damit einen Zellinnenraum von der Umwelt. Diese Membran besitzt einen hydrophoben Kernbereich, während die polaren Molekülbestandteile zur wässrigen Umgebung exponiert sind. Amphiphile Lipide bilden eine kontinuierliche planare Doppelschicht mit 4–5 nm Dicke, in die sich Membranproteine aufgrund direkter Wechselwirkung mit den Lipiden ein- und anlagern [3]. Aufbauend auf dem von E. Overton beim Übergang vom 19. ins 20. Jahrhundert formulierten Konzept (zusammengefasst in [4]) entwickelte sich durch vielfältige experimentelle Belege die heutige Vorstellung über biologische Membranen. Während das klassische Membranmodell, das 1972 von S.J. Singer und G.L. Nicolson entworfen wurde, davon ausging, dass integrale Proteine und Lipide frei innerhalb der zweidimensionalen Fläche diffundieren können (Fluid-Mosaik) [5, 6], kamen in der nachfolgenden Zeit immer mehr Hinweise auf eine eingeschränkte Beweglichkeit (z.B. [7]). So führen spezifische Wechselwirkungen von Lipiden und Proteinen zu einer stärkeren Strukturierung und geringeren Fluidität [8–10]. Die Doppelschicht stellt eine physikalische Barriere für den Transport von Substanzen dar. Integrale Membranproteine erlauben eine Regulation der Permeabilität dieser Barriere. Dadurch bewerkstelligen diese Proteine sowohl den Stoff- als auch den Informationsaustausch über die Lipiddoppelschicht (siehe Abb. 3.1).

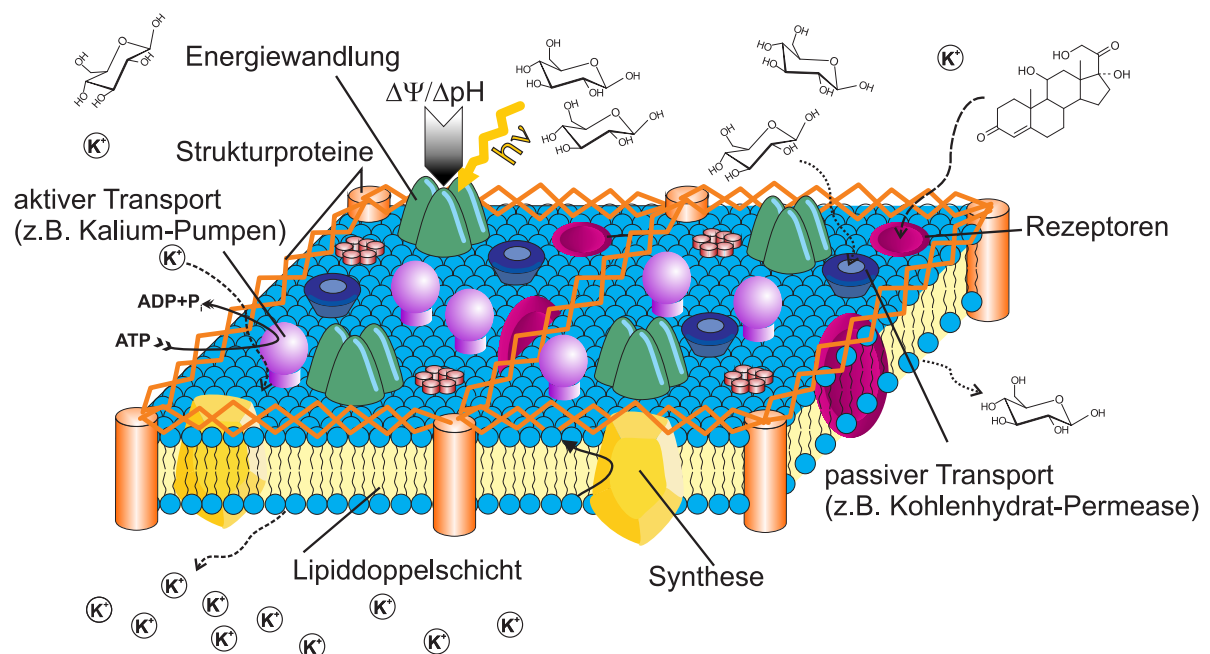


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung einer biologischen Membran. In die Lipiddoppelschicht sind Membranproteine mit unterschiedlichen Aufgaben eingebaut.

Die unterschiedlichen Funktionen der Membranproteine spiegeln sich auch in ihrer Vielfalt wider. Mindestens 30% aller vom Genom kodierten Proteine sind Membranproteine [11]. Membranintegrale

Proteine können die Membrandurchlässigkeit steuern, in dem sie die Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten erleichtern (passiver Transport, in Abb. 3.1 gezeigt anhand des Transports von Kohlenhydraten). Demgegenüber sind Pumpen auch in der Lage, gegen einen solchen Gradienten zu arbeiten (in Abb. 3.1 der Transport von Kaliumionen). Dies setzt voraus, dass eine Energiequelle zur Verfügung steht, wie beispielsweise der zelluläre Energieträger Adenosintriphosphat (ATP). An der Synthese von ATP sind wiederum Membranproteine maßgeblich beteiligt. Nach P. Mitchell (Nobelpreis für Chemie 1978) wird dabei zunächst ein elektrochemischer Protonengradient ($\Delta\Psi/\Delta\text{pH}$) über der Membran aufgebaut und anschließend zur Knüpfung einer Phosphorsäureanhydrid-Bindung genutzt [12]. Die wichtigsten Reaktionsketten dieser Energiewandlung ermöglichen die Nutzung von Sonnenlicht (Photophosphorylierung) oder von Reduktionsäquivalenten aus energiereichen Substraten bei der Atmung (oxidative Phosphorylierung). Andere Membranproteine fungieren als Katalysatoren zur Synthese hydrophober Substrate sowie als Strukturelemente (z.B. Filamentstrukturen wie in Abb. 3.1). Für die Kommunikation der Zelle sind diverse Rezeptoren verantwortlich, die Signale aus der Umgebung in das Zellinnere weitervermitteln können. Die unterschiedlichen Funktionen der Membranproteine führen dazu, dass sie die interessantesten Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Medikamente in der Pharmaindustrie darstellen. So geht man davon aus, dass die Zielproteine für 60% aller Medikamente Membranproteine sind [13], mit G-Proteingekoppelten Rezeptoren, Transportern und Kanälen als wichtigsten Klassen [14, 15]. Aber auch die als Strukturelemente dienenden Membranproteine können bei Krankheiten von entscheidender Bedeutung sein [16].

3.2 Organisation von Proteinkomplexen

Auch wenn einzelne Proteine schon in der Lage sind, diverse Aufgaben zu erfüllen, so steigert sich die Effizienz bei hoch entwickelten Proteinkomplexen, und anspruchsvolle Reaktionsfolgen werden realisierbar. Anfang des 20. Jahrhunderts half vor allem die von T. Svedberg (Nobelpreis für Chemie 1926) entwickelte Ultrazentrifugation bei der Aufklärung, dass mehrere Polypeptidketten eine größere Einheit wie das Hämoglobin [17] bilden können. Durch die Weiterentwicklung proteinchemischer Methoden gelang auch der Nachweis von immer mehr Proteinkomplexen (z.B. [18]). Außerdem wurde aus den Analysen klar, dass viele Proteinkomplexe sehr diffizil aufgebaut sind, wie Komplex I der Atmungskette, der aus 46 Proteinuntereinheiten besteht [19]. Die Bestätigung durch unterschiedliche Techniken verdeutlichte, dass Multienzym-Komplexe keine zufälligen Aggregationen, sondern geordnete Strukturen darstellen [20, 21]. Daher war basierend auf den schon etablierten Bezeichnungen der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur [22] sowie der Quartärstruktur [23] eine weitere erforderlich. Mit der Quintärstruktur können spezifische Proteinwechselwirkungs-Netzwerke beschrieben werden [24]. Als Beispiele dazu sind helikale Strukturen [25], transiente Wechselwirkungen von Makromolekülen [26] oder die Anordnung von Citratzyklus-Enzymen als eine zusammengehörige metabolische Einheit [27] aufgeführt. Allerdings ist die Definition nicht einheitlich [28], so findet sich der Begriff der Quintärstruktur nur selten in der Literatur.

Gerade die Organisation zu stöchiometrischen Komplexen ermöglicht es, Enzyme eines bestimmten Stoffwechselwegs (z.B. Protein-, Glykogen- oder Lipidbiosynthese) so anzuordnen, dass Zwischenprodukte direkt zum nächsten Prozessierungsschritt weitergeleitet werden (Substratkanalisierung). Somit kann die Effizienz von enzymatischen Reaktionen in den unterschiedlichen Zellorganellen gesteigert werden. Derartige Proteinassoziate besitzen häufig sehr hohe molare Massen, wie schon 1952 eindrucksvoll die Nachweise des Pyruvat-Dehydrogenase- [29] und des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes [30] mit jeweils deutlich mehr als 10^6 g/mol zeigten. Für Komplexe von Enzymen einer Stoffwechselsequenz, die quasi ein Subkompartiment in einem definierten Reaktionsraum darstellen [31], wurde von P.A. Srere der Begriff des Metabolons eingeführt [32, 33]. Während sich die ersten Untersuchungen hierzu auf Tiere konzentrierten, ließen sich in nachfolgender Zeit auch in Pflanzen vergleichbare Strukturen identifizieren [34, 35].

Ein wichtiger Aspekt in diesem Zusammenhang ist das Phänomen des „Macromolecular Crowdings“. Im Gegensatz zu vielen Lösungen, die meist bei in-vitro-Versuchen eingesetzt werden, sind die Konzentrationen an Makromolekülen innerhalb biologischer Zellen sehr hoch. Zum Beispiel liegt die Proteinkonzentration in der Zelle bei 200 – 300 g/L (z.B. [36, 37]). Es kann davon ausgegangen werden, dass 20–30% des Zellinnenvolumens von Makromolekülen eingenommen wird. Dadurch, dass nun Proteine aufgrund des beengten Platzes in der Zelle in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, verstärken sich Wechselwirkungen zwischen bestimmten Proteinen bzw. Bereichen mit komplementären Eigenschaften und erleichtern die Ausbildung definierter Komplexe [38, 39]. So sind vermutlich die meisten Enzyme an weitere Proteine bzw. andere Biomakromoleküle (zumindest kurzzeitig) gebunden. Um diese Situation in der Zelle zu beschreiben, dient der Begriff „Macromolecular Confinement“ [40]. Abschätzungen reichen von 60% der Enzyme in gebundener Form, wie für eine Glycerylphosphorylcholin-Phosphodiesterase gefunden [41], bis zu fast 100%. Solch hohe Werte resultieren aus Versuchen, die z. B. an dem „Augentierchen“ *Euglena gracilis* durchgeführt wurden [42, 43]. Eine Zelle beinhaltet also statt sehr vielen zufällig kollidierenden Einzelproteinen vielmehr eine Ansammlung von Proteinmaschinen, die aus zehn oder mehr Proteinen bestehen [44].

Sehr hohe lokale Proteinkonzentrationen liegen vor allem in biologischen Membranen vor, ein zweidimensionales Crowding. Außerdem haben die Membranproteine eine Vorzugsorientierung zur Ebene der Lipiddoppelschicht. Somit ist die Interaktion von Membranproteinen und die Zusammenlagerung zu Proteinkomplexen erleichtert [45, 46]. Aber auch die Lipide können eine Gitterstruktur ausbilden [47]. Dadurch entsteht eine supramolekulare Organisation in der Membran, wie sie z.B. für Rezeptoren [48] und Aquaporine [49] gefunden wurde. Die größten Anteile an Membranproteinen im Verhältnis zu den Lipiden hat man für Membranen bestimmt, die für die Energieumwandlung zuständig sind. Dementsprechend sind zahlreiche Protein-Protein-Wechselwirkungen zu erwarten. Zur Aufklärung der supramolekularen Organisation der Photosynthese und der Atmungskette gibt es vielfältige Bestrebungen. Grundlegende anschauliche Eindrücke für die Organisation photosynthetischer Membranen vermittelte die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie [50, 51]. Später ermöglichte die Einzelpartikelanalyse einen detaillierten Einblick in isolierte Chlorophyll-Protein-Superkomplexe [52, 53]. Aber nicht nur unter Vakuumbedingungen des Elektronenmikroskops, sondern auch im physiologischen Puffer ist eine Visualisierung möglich. Bei photosynthetischen Bakterien konnte die Raster-Kraft-Mikroskopie an nativen Membranen die Organisation der Photosysteme zeigen [54–56] und mittlerweile bei höheren Pflanzen ebenfalls [57]. Für die mitochondriale Atmungskette lieferte nach einer strukturellen Charakterisierung wiederum durch Gefrierbruch–Elektronenmikroskopie [58] vor allem die native Gelelektrophorese einen entscheidenden Beitrag zur Identifikation von Protein-Superkomplexen (z.B. [59, 60]). Aber auch durch die Chromatographie konnten Superkomplexe von kleineren Strukturen getrennt und nachgewiesen werden. [61] Auf der experimentellen Basis für die Existenz von supramolekularen Assoziaten werden nun auch die funktionellen Konsequenzen z.B. für den Elektronentransport der Atmungskette untersucht [62].

3.3 Isolierung von Membranproteinen

3.3.1 Solubilisierung

Die Anordnung von Proteinen in einer Membran ermöglicht die Durchführung von Reaktionen, die ohne Aufteilung unterschiedlicher Reaktionsräume kaum realisierbar sind. Allerdings erschwert eine derartige Verankerung die Isolierung intakter Membranproteine, da die Extraktionsprozedur aggressiv genug sein muss, um die Membran aufzulösen und gleichzeitig empfindliche Proteinkomplexe nicht beeinträchtigen darf. Durch Zugabe geeigneter Detergenzien kann eine milde Solubilisierung erreicht werden [63, 64]. Meist muss hierbei die Detergenzkonzentration mindestens so hoch gewählt werden, dass sich Mizellen ausbilden können (cmc).

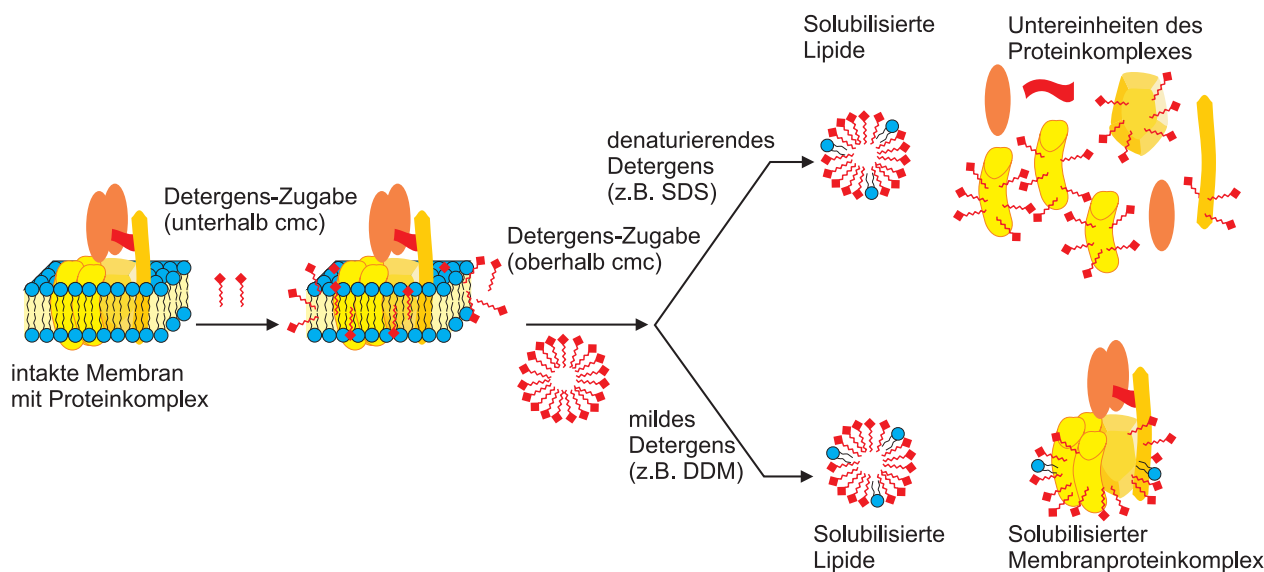


Abbildung 3.2: Solubilisierung von Membranproteinkomplexen. Bei denaturierenden Detergenzien werden Proteinkomplexe während der Solubilisierung in ihre Untereinheiten disassembliert, wobei die Detergensmoleküle an die hydrophoben Untereinheiten binden. Milde Detergenzien können den Proteinkomplex in intakter Form solubilisieren.

Beim Solubilisieren (wie in Abb. 3.2 gezeigt) bedeckt ein Mantel aus Detergensmolekülen die hydrophoben Bereiche der Membranproteine und ermöglicht so den Übergang in eine wässrige Lösung. Erstaunlicherweise ist diese Detergenshülle sogar in der Lage, Membranproteinkomplexe unter Vakuumbedingungen zu stabilisieren [65]. Einen entscheidenden Einfluss auf den Ablauf der Solubilisierung hat, wie zuvor angedeutet, die Art des eingesetzten Detergens. Mit ionischen Detergenzien lässt sich zwar häufig ein größerer Anteil an Proteinen aus der Membran herauslösen, aber Proteinkomplexe werden leichter in ihre Untereinheiten disassembliert und essentielle an das Protein angelagerte Lipidmoleküle entfernt (siehe Abb. 3.2). Meist sind umfangreiche Tests erforderlich, um das geeignete Detergens zur Isolierung eines bestimmten Membranproteins zu finden, wie schon Versuche mit der Cytochrom-c-Oxidase von 1955 zeigten [66]. An der empirischen Auswahl hat sich seitdem nicht viel geändert, denn parallel zu dem Zuwachs an Wissen über erfolgreiches Solubilisieren unterschiedlicher Proteine hat sich auch die Anzahl der zur Verfügung stehenden Detergensvarianten erhöht. Im Allgemeinen fällt bei Membranproteinkomplexen die Wahl eher auf nichtionische Moleküle, wie beispielsweise Dodecylmaltosid oder Digitonin (siehe Abb. 3.3).

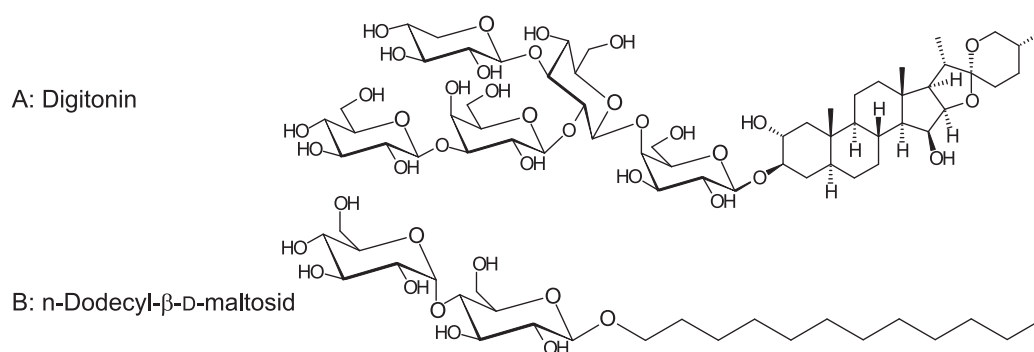


Abbildung 3.3: Beispiele für Strukturformeln nichtionischer Detergenzien zur milden Solubilisierung von Membranproteinen.

Das von O. Schmiedeberg 1875 aus dem Samen des Fingerhuts isolierte und benannte Digitonin [67] wurde seit Ende des 19. Jahrhunderts genauer analysiert. Bedeutende Beiträge zu dessen Strukturaufklärung kamen dabei aus dem Labor von H. Kiliani [68–70], unter anderem auch von A. Windaus (Nobelpreis für Chemie, 1928). Zusätzlich zu den Untersuchungen der Struktur wurde vor allem die spezifische Wechselwirkung mit Cholesterol entschlüsselt [71–73]. In den 1930er Jahren erschienen dann erste Berichte über die Detergens-Wirkung des Digitonins, wie zur Isolierung von Sehpurpur [74] oder von Chlorophyll-Protein-Komplexen [75]. Mitte der 1950er Jahre etablierte sich Digitonin für die Isolierung mitochondrialer Proteine, sowohl aus Tieren [76–78], als auch aus Pflanzen [79]. Neben der Möglichkeit, Membranproteine zu solubilisieren, kann Digitonin bei Thylakoidmembranen auch zur Fraktionierung in Stroma- und Granaregionen eingesetzt werden [80–85].

Während das kommerziell verfügbare Digitonin direkt aus den Fingerhutsamen isoliert wird, sind die meisten anderen Detergenzien durch chemische Synthesen in größerem Maßstab herstellbar. Vielfältige Anwendungen finden heutzutage die auf Mono- oder Disacchariden basierenden Detergenzien [86], mit Octylglucosid als Prototyp. Durch die Arbeiten von E. Fischer und seinen Mitarbeitern wurden Anfang des 20. Jahrhunderts eine große Reihe von Alkylglucosiden verfügbar (z.B. [87, 88]). In nachfolgender Zeit konnte nicht nur die Synthese dieser Substanzen optimiert werden [89], auch ihre physikochemischen Eigenschaften sowie ihr Anwendungsspektrum wurden untersucht [90]. So sind Alkylglucoside oberflächenaktive Substanzen, die besser an Grenzflächen adsorbieren und geringere Werte für die cmc aufweisen als vergleichbare ionische Kolloide [91, 92]. Ab Mitte der 1970er Jahre fanden dann durch weitere Optimierungen der Synthesebedingungen sowohl Octylglucosid als auch Dodecylmaltosid breite Verwendung in der Biochemie [93–95]. Neben Digitonin gehört auch Dodecylmaltosid (DDM) zu den mildesten Detergenzien. Vor allem bei der Strukturaufklärung von Membranproteinen hat sich Dodecylmaltosid bewährt. Wenn man die Vielzahl der bekannten Detergenzien berücksichtigt, liegt der Anteil der Reinigungsvorschriften, bei denen Membranproteine solubilisiert und schließlich auch erfolgreich kristallisiert werden konnten, bei DDM mit fast 25% erstaunlich hoch [96].

3.3.2 Reinigung von solubilisierten Membranproteinen

Aufgrund der enormen Bedeutung von Rezeptoren für die Entwicklung neuer Pharmaka gibt es mittlerweile vielfältige Bestrebungen, Membranproteine mit speziellen Modifikationen für eine Affinitätsaufreinigung in schnell wachsenden Organismen [97–101] oder zellfrei [102–104] in großem Maßstab zu exprimieren. Bei Membranproteinkomplexen erreicht diese Methode allerdings ihre Grenzen. So kann zwar mit den aktuellen Prozeduren auch begonnen werden, einfache Komplexe wie Heterodimere zu exprimieren [105], aber z.B. für die Multiproteinkomplexe der energieumwandelnden Membranen sind analoge Ansätze noch in weiter Ferne. So ist man hier auf die meist mühselige Isolierung aus einem bestimmten Organismus angewiesen. Im Anschluss an eine Solubilisierung der biologischen Membran müssen daher weitere Reinigungsverfahren eingesetzt werden, um einen ganz bestimmten Membranproteinkomplex zu erhalten (siehe Abb. 3.4).

Vor allem die unterschiedlichen chromatographischen Methoden eignen sich zur Isolierung der Membranproteinkomplexe [106–108]. Ein Vergleich der Methoden, die als finaler Reinigungsschritt vor der Strukturaufklärung eingesetzt wurden, ergab einen sehr hohen Anteil der Größenausschluss-Chromatographie (51,1%) und der Ionenaustausch-Chromatographie (27,7%) [96]. Vor allem die hohe Trennschärfe von aktuellen Ionenaustauschern prädestinieren sie für Hochdurchsatz-Separationen bei der Membranproteomik [109, 110]. Für viele Isolierungsvorschriften ist der Einsatz der Dichtegradienten-Zentrifugation unabdingbar. Denn mit dieser Methode lassen sich Zellorganellen trennen [111–120], unterschiedliche Membranen separieren [121–124], aber auch Membranproteinkomplexe fraktionieren [125–128]. Bei der Isolierung von bestimmten Zellorganellen bzw. Membranen finden in zunehmenden Maße wässrige Zwei-Phasen-Systeme mit Detergens und Polymeren Anwendung [129–131]. Um einen bestimmten Proteinkomplex in kleinem Maßstab aber in reiner Form zu erhalten, eignet sich auch die

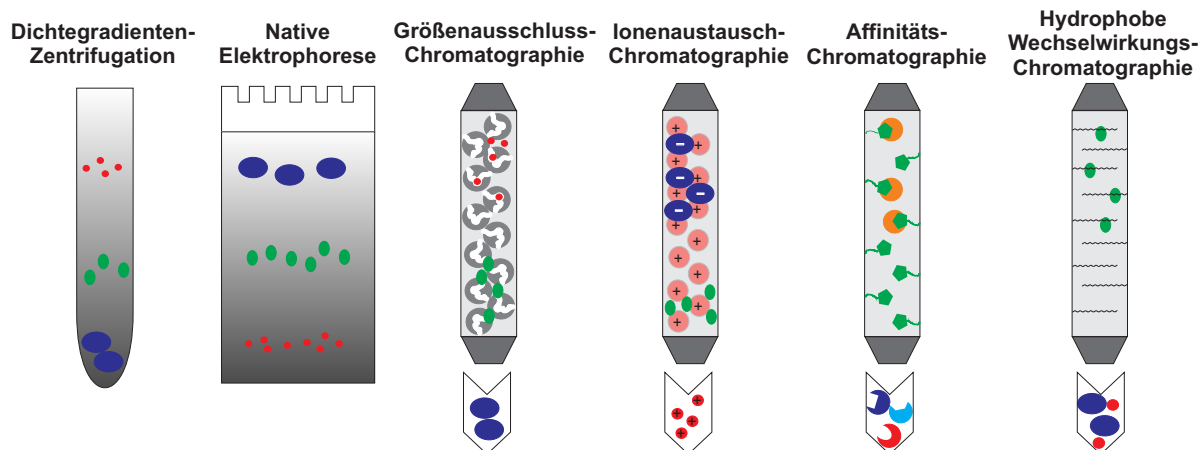


Abbildung 3.4: Methoden zur Reinigung von Proteinen. Für die Dichtegradienten-Zentrifugation und die native Elektrophorese ist die resultierende Molekülverteilung beim Ende des Verfahrens gezeigt. Bei den chromatographischen Methoden ist die Verteilung während der Elution zu sehen, wobei die Moleküle im Pfeil schon von der Säule eluiert sind. Die ersten drei Verfahren (Dichtegradienten-Zentrifugation, native Elektrophorese und Größenausschluss-Chromatographie) trennen Proteine nach ihrer Größe. Bei Ionenaustauschern erfolgt die Fraktionierung basierend auf der Eigenladung, während bei der Affinitäts-Chromatographie eine spezifische Erkennung bestimmter Zielmoleküle stattfindet. Eine andere Möglichkeit ist die Trennung aufgrund hydrophober Eigenschaften an Säulen mit aliphatischen oder aromatischen Matrices.

präparative native Elektrophorese sehr gut, wie in [132] ausführlich dargestellt. Einige Methoden, wie die Free-Flow-Elektrophorese [133, 134] oder die Trennung in überkritischen Flüssigkeiten [135], zeigen zwar sehr viel versprechende Trenneigenschaften, sind aber noch nicht weit verbreitet.

3.4 Strukturaufklärung von Membranproteinen

Die große Bedeutung von Membranproteinen (siehe Abschnitt 3.1) führt zu vielfältigen Bestrebungen, ihre Struktur und Funktion zu entschlüsseln. Bei wasserlöslichen Proteinen ist die Röntgendiffraktion oft das Mittel der Wahl zur Strukturaufklärung, um also hochauflösende Einblicke in den Aufbau dieser Proteine zu ermöglichen. Die Voraussetzung für diese Methode ist die Verfügbarkeit von hochgeordneten 3D-Proteinkristallen. Zur Ermittlung geeigneter Bedingungen für die Kristallisation werden mittlerweile häufig Pipettierroboter eingesetzt. Durch Einsatz solcher automatisierter Verfahren existieren große Datenbanken mit Strukturen wasserlöslicher Proteine in atomarer Auflösung selbst für verschiedene Säugtiere. So enthält die PDB-Datenbank des Brookhaven National Laboratory (<http://www.rcsb.org/pdb/>) zur Zeit (Anfang Juni 2010) ca. 56.000 Einträge für Proteine/Proteinkomplexe, deren Struktur über Röntgendiffraktion gelöst wurde. Demgegenüber liegt die Gesamtzahl der Membranproteinstrukturen momentan bei etwa 240 in der Datenbank von S. White (Universität von Kalifornien, Irvine, http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html). Hierbei sind die Daten aller Strukturaufklärungsmethoden zusammengefasst, und gleiche Proteine aus unterschiedlichen Spezies sind separat in dieser Datenbank hinterlegt. Daher sind weniger als 1% aller hochauflösenden Proteinstrukturen solche von Membranproteinen [136]. Während für wasserlösliche Proteine Ansätze mit standardisierten Additiv-Mischungen in vielen Fällen zum Erfolg führen, ist bei Membranproteinen oft sogar die Präparation von geeignetem Ausgangsmaterial zur Kristallisation problematisch.

Die in den letzten Jahren deutlich steigende Anzahl von Membranproteinstrukturen ist den weltweiten Anstrengungen zu verdanken, um dreidimensionale Kristalle dieser Makromoleküle zu erhalten (z.B. [137–145]). Trotzdem sind viele Details, die z.B. zur Entwicklung neuer Medikamente gegen

Krankheiten benötigt werden, noch unentdeckt. Die Einführung neuer Techniken, wie die Antikörper-Fragment vermittelte Kristallisation [141, 146] oder die Einbettung in kubische Lipidphasen [147] bzw. Lipid-Schwammphasen [148], lässt für die Zukunft hoffen, dass noch weit mehr Membranproteinstrukturen aufgeklärt werden können. Neben der Röntgenstrukturanalyse ist die Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) von sehr großer Bedeutung bei der Strukturaufklärung von Proteinen. In der Membranprotein-Datenbank (http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html) sind unter den 240 Strukturen 39, die durch NMR bestimmt wurden. Für die Messung in Lösung eignen sich periphere aber auch integrale Membranproteine [149]. Ähnlich wie bei der Kristallisation sollten membranintegrale Proteine für die Untersuchung mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie in solubilisierter Form vorliegen, oft in Mizellen oder Bizellen [150]. Ein Vorteil im Vergleich zur Strukturanalyse an Hand von 3D-Kristallen ist die Möglichkeit, auch flexiblere Bereiche von Proteinen zu erfassen und somit Aussagen über die Proteindynamik zu erhalten [151]. Allerdings müssen für die NMR-Untersuchung Proteinlösungen mit Konzentrationen im Bereich von mehreren mg/mL vorliegen, was bei Membranproteinen teilweise schwierig zu erreichen ist. Eine andere Limitierung ist die steigende Komplexität der Messsignale mit zunehmender Proteingröße, so wird momentan als Grenze für die Strukturaufklärung mittels NMR in Lösung eine molare Masse von etwa 100.000 g/mol angegeben [152]. Statt als solubilierte Spezies können derartige Analysen von Membranproteinen aber auch als Festphasen-NMR an Membransystemen stattfinden. Aber die bisherigen Anwendungen dieser Technik konzentrieren sich weniger auf die Aufklärung einer vollständigen Proteinstruktur, sondern vorwiegend auf die Interaktion kleinerer Metabolite mit Membranproteinen. So wird die Festphasenmethode zur Untersuchung von Transportproteinen eingesetzt, um die Translokation kleiner Moleküle zu verfolgen [153], oder zur Charakterisierung der Bindung von Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [154].

Wenn keine 3D-Kristalle oder auch keine geeignete Probe zur Vorbereitung der NMR zur Verfügung stehen, gibt es eine Reihe von Techniken, um trotzdem wichtige Informationen über Membranproteine zu erhalten (z.B. [155, 156]). Diese Methoden sind aber nicht nur als Alternative sondern auch als Ergänzung zu den zuvor beschriebenen Verfahren anzusehen, da ein einzelner Weg meist nur einen ausgewählten Ausschnitt zeigt. So vervollständigen sich die Informationen unterschiedlicher Verfahren zu einem komplexen Gesamtbild [157–160].

Viele klassische Techniken, wie die Infrarotspektroskopie (IR) oder der Circular dichroismus (CD), können als Routineverfahren nützliche Informationen über Strukturelemente oder die Dynamik von Proteinen liefern [161–167]. Für die Bestimmung von Abständen bzw. Wechselwirkungen von Proteinen mit Substraten oder anderen Proteinen, leisten die Fluoreszenzspektroskopie und die Elektronenspin-Resonanzspektroskopie sehr wichtige Beiträge [168–173]. Die zuletzt genannte Methode basiert auf der Aufspaltung von Energieniveaus in einem Magnetfeld und setzt ungepaarte Elektronenspins voraus. Solche Voraussetzungen für das Verfahren der Elektronenspinresonanz sind bei etlichen Proteinen mit Metallzentren oder aber mit Radikalen (z.B. Tyrosyl-Radikale oder Spin-Markierungen) gegeben. Bei der Fluoreszenzspektroskopie findet meist zunächst eine Markierung mit geeigneten Sonden statt. Danach kann die Messung in Fluoreszenzspektrometern erfolgen, die in vielen Labors zu finden sind. Auch die Massenspektrometrie ist mittlerweile weit verbreitet und wird routinemäßig zur Identifizierung von Proteinen eingesetzt. Aber nicht nur für Verfahren mit hohem Probendurchsatz sondern auch für detaillierte Analysen eines einzelnen Proteins oder Proteinkomplexes eignet sie sich. So können Protein-Interaktionen untersucht werden, wobei meist eine Kombination mit chemischer Quervernetzung genutzt wird [174]. Dass eine kovalente Verknüpfung von Polypeptidketten aber nicht zwingend erforderlich ist, zeigen Studien, bei denen Proteinkomplexe unter den Bedingungen der Massenspektrometrie erhalten bleiben [175–177].

Sowohl die Isolierung als auch die anschließende Kristallisation von Membranproteinen stellen in der Biochemie eine große Herausforderung dar. Insbesondere, wenn die Membranproteine als Komplexe aus vielen unterschiedlichen Untereinheiten vorliegen, ist es schwierig, ein Puffersystem mit den geeigneten Additiven zu finden, das die Langzeit-Stabilität gewährleistet. Eine solche Stabilität ist aber wiederum die Voraussetzung für die Reinigung des Zielproteins, um überhaupt erst das Ausgangsmate-

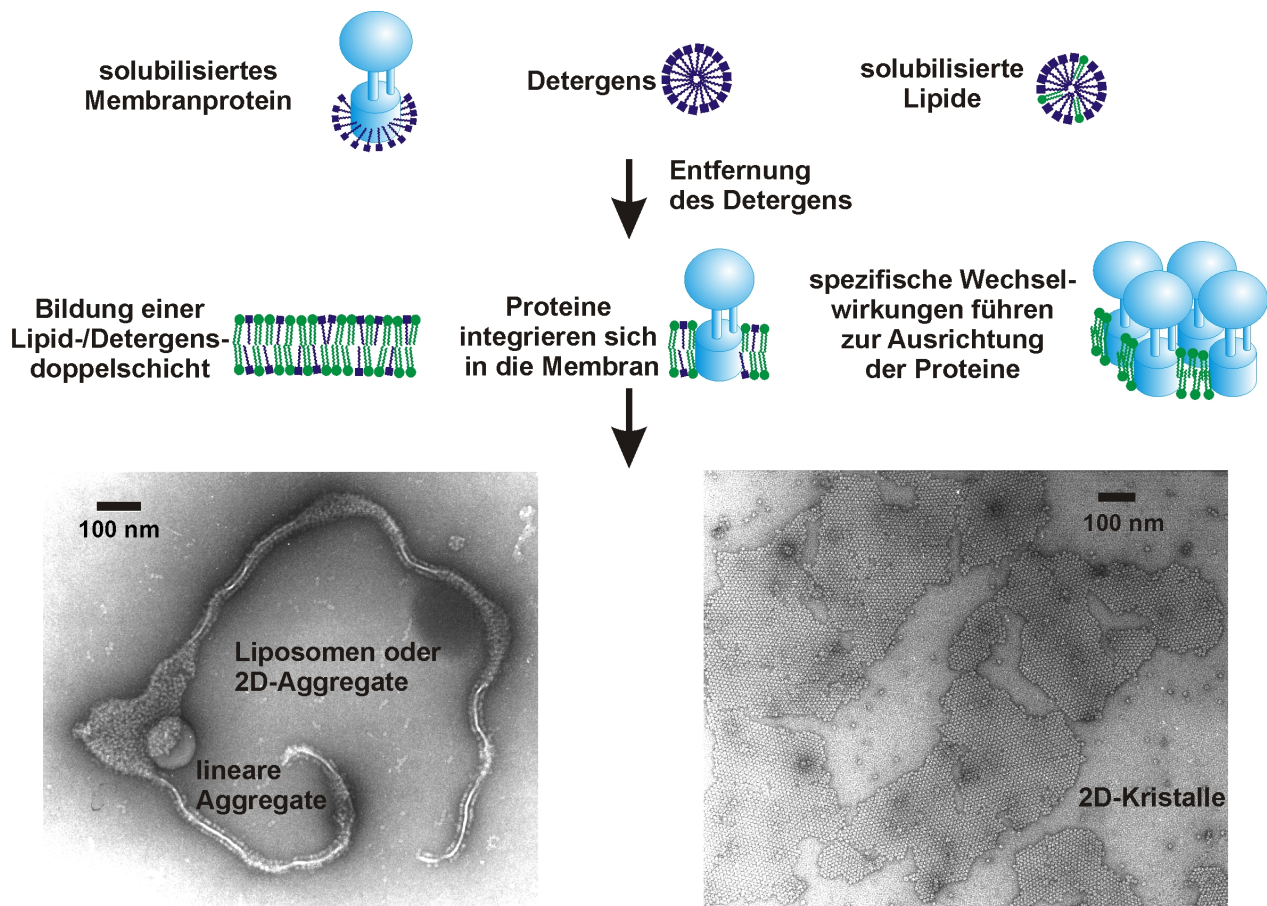


Abbildung 3.5: Zweidimensionale Kristallisation von Proteinen. Durch die Entfernung des Detergens aus der ternären Mischung Membranprotein-Lipid-Detergens bilden sich spontan Lipid-Protein-Doppelschichten. Spezifische Wechselwirkungen können dazu führen, dass sich die Proteine bei diesem Prozess in einem zweidimensionalen Gitter anordnen. Die unterschiedlichen Strukturen sind an Hand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt. Hierbei wurde Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat als Probe für einen 2D-Kristallisationsansatz verwendet. Nach Zugabe einer Lipidmischung aus Sojabohnen (Asolectin) erfolgte die Kristallisation durch Entfernung des Detergens DDM durch Adsorption. Vor der elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden die Proben mit Uranylacetat negativ kontrastiert. Die Abbildung ist modifiziert aus der Dissertation entnommen [178].

rial für alle weiteren Versuche zu erhalten. Im Gegensatz zur Röntgenkristallographie mit ihren hohen Anforderungen an die Probe können Einzelpartikel-Studien direkt nach einer Detergens-basierten Solubilisierung und grober Vorreinigung durchgeführt werden [179, 180]. Für eine derartige Analyse erfolgt die Auswahl der gesuchten Proteinspezies mittels Elektronenmikroskopie. Hierbei wird die Probe mit dem Protein(komplex) zunächst auf ein Probenträgernetzchen aufgetragen. Wenn man einzelne Proteine oder kleine Proteinkomplexe untersuchen will, ist die einfachste Möglichkeit für die Visualisierung die sogenannte Negativkontrastierung mit Schwermetallsalz-Lösungen. Allerdings wird der verbesserte visuelle Kontrast und die hohe Stabilität des somit erhaltenen Präparats unter den Vakuumbedingungen des Elektronenmikroskops auf Kosten der biologischen Relevanz und der Auflösung erreicht. Durch die Negativkontrastierung richtet sich die Analyse auf die Metallschicht, in die die Proteinspezies eingebettet sind. Dadurch werden wichtige Details überdeckt, und zusätzlich kann es noch zu starken Änderungen der Proteinoberfläche kommen. Diese Probleme lassen sich durch eine Einbettung in amorphes Eis vermeiden. Mittels Kryoelektronenmikroskopie und geeigneter Bildverarbeitung können hochauflösende Einblicke in den Aufbau nativer großer Makromoleküle erzielt werden [128, 181, 182]. Auch die frühe-

ren Beschränkungen der Einzelpartikelanalyse sind in den letzten Jahren durch verbesserte Techniken aufgehoben worden, so dass die Auflösung allmählich den Subnanometer-Bereich erreicht [183].

Da Membranproteine *in vivo* in ihre biologische Membran integriert sind, weisen sie als Detergens-solubilisierter Spezies andere Eigenschaften als in einer natürlichen Lipidumgebung auf. Daher spiegeln strukturelle Analysen nativer Membranen oder rekonstituierter Systeme besser den biologischen Kontext wider. Auch für derartige Anwendungen ist die Elektronenmikroskopie wieder eine wichtige Grundlage. Zunächst erlaubt sie ein schnelles Sichten unterschiedlicher Probenansätze, kann dann aber auch zur endgültigen Strukturanalyse mit hoher Auflösung eingesetzt werden, als sogenannte Elektronenkristallographie [184]. Als Probenmaterial sollten die Membranproteine in einem festen zweidimensionalen Gitter vorliegen. Eine nahezu kristalline Anordnung (zweidimensionaler Kristall) ist dabei vorteilhaft, um hohe Auflösungen zu erreichen. Diese 2D-Kristalle wiederum erhält man üblicherweise durch die Entfernung des Detergens aus einer Mischung des gereinigten Membranproteins in Detergensiösung mit bestimmten Lipiden [185, 186], wie schematisch in Abb. 3.5 gezeigt. Über den Erfolg des Verfahrens (hochgeordnete 2D-Strukturen) entscheidet dabei meist der Schritt des Verringerens der Detergensenkonzentration. Um unterhalb einer Konzentration zu kommen, ab der die Bildung von Lipid-Protein-Gittern möglich ist, wird häufig die Dialyse eingesetzt. Daneben kann aber auch die Adsorption des Detergens an hydrophobe Kügelchen [187], oder die kontrollierte Verdünnung [188] verwendet werden. Auch wenn zur Visualisierung der 2D-Kristalle statt der klassischen Negativkontrastierung die Kryoelektronenmikroskopie dient, liegt der generelle Nachteil der Elektronenmikroskopie aber immer in der Exposition von empfindlichen biologischen Proben gegenüber Vakuumbedingungen.

Wenn eine Probe statt fixiert oder tiefgefroren in einer physiologischen Pufferumgebung strukturell untersucht werden soll, eignet sich die Raster-Kraft-Mikroskopie (engl. atomic force microscopy, AFM). Diese Methode wurde von G. Binnig *et al.* im Jahr 1986 vorgestellt [189]. Im gleichen Jahr erhielt er auch den Nobelpreis für Physik für die Entwicklung des Rastertunnelmikroskops (zusammen mit H. Rohrer). Zusammen mit Binnig und Rohrer kam E. Ruska ebenso im Jahr 1986 zur späten Ehre des Nobelpreises für die Entwicklung des Elektronenmikroskops. Bei der Raster-Kraft-Mikroskopie tastet eine sehr dünne Spitze (im Idealfall nur ein Atom) die Probe ab und detektiert das Oberflächenprofil. Die Messspitze befindet sich an einem Cantilever (Hebelarm/Blattfeder), dessen Auslenkung meist über einen Laserstrahl und Photodetektoren aufgezeichnet bzw. gesteuert werden. Wenn die Messspitze an eine Probe in einer Flüssigkeits-Messzelle herangeführt wird, sind zunächst die anziehenden Kapillarkräfte entscheidend. In größerer Nähe zur Probe überwiegen van-der-Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen. Bei der zeilenweisen Abtastung biologischer Proben können unterschiedliche Messmodi eingesetzt werden [190]. Eine sehr hohe Auflösung bietet der Kontaktmodus, bei dem die Spitze so nah an das Untersuchungsobjekt geführt wird, bis die repulsiven Wechselwirkungen dominieren und die Spitze von der Probe weg gelenkt wird. Hierbei kommt es zwar zu einer starken mechanischen Beanspruchung des weichen biologischen Materials, aber die erreichte Bildqualität ist anderen Aufnahmemodi mit größeren Abständen, bei denen die Spitze in oszillierende Bewegung versetzt wurde, überlegen [191]. Gerade für die Untersuchung von Membranproteinen hat sich die Raster-Kraft-Mikroskopie mittlerweile durchgesetzt und ergänzt sich optimal mit der Elektronenmikroskopie [192–194]. Die Möglichkeit zur Darstellung der Topographie von isolierten, nativen Membranen mit hoher Proteindichte kann nun auch auf die Visualisierung lebender Zellen ausgedehnt werden [195]. Der große Vorteil der Methode besteht darin, dass nicht nur das Oberflächenprofil der Probe sondern eine Reihe weiterer Eigenschaften (Elastizität, elektrostatisches Potenzial, Ionenleitfähigkeit) erfasst werden können. Außerdem lässt sich durch Berührung von Proteinen mit der Spitze und anschließendem Herausziehen der Polypeptidkette aus der Membran ein Kraftspektrum aufnehmen [196]. Für viele spezielle Anwendungen kann die Messspitze auf unterschiedliche Weise funktionalisiert werden [193], zum Beispiel zur direkten Messung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Eine weitere Möglichkeit bei der AFM ist die Verwendung der Messspitze als Nanomanipulator, beispielsweise um bei ATP-Synthasen den hydrophilen vom membranintegralen Subkomplex zu trennen [197].

3.5 Energieumwandelnde Membranproteine

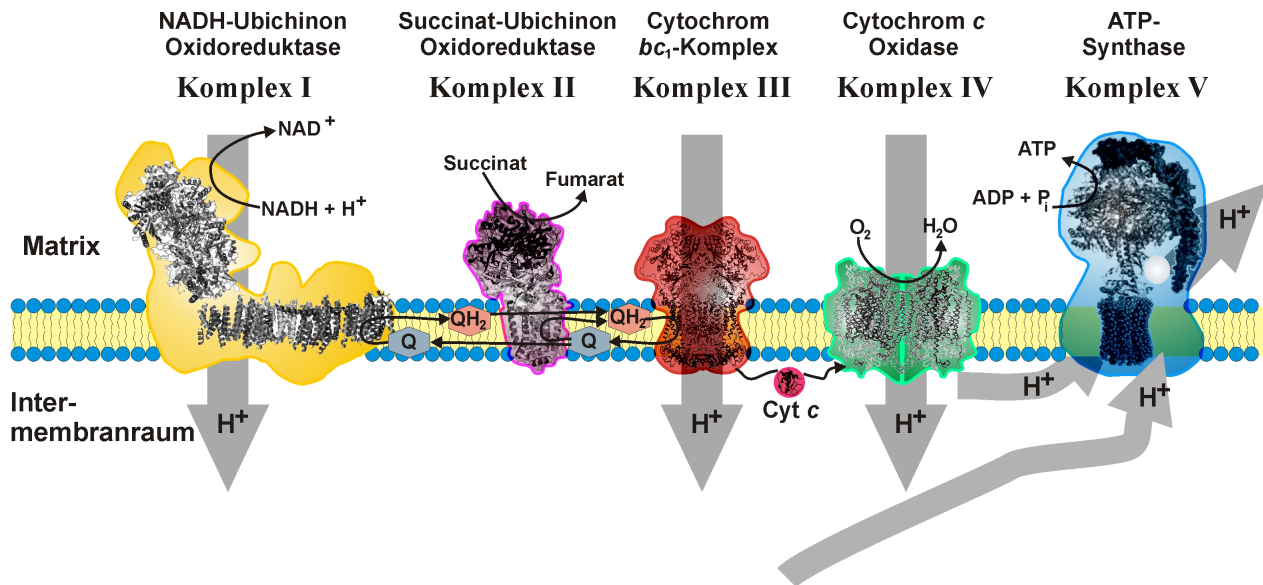


Abbildung 3.6: Klassische Vorstellung von der Anordnung der Atmungskettenkomplexe in der inneren mitochondrialen Membran. Elektronen werden von NADH oder Succinat zum terminalen Akzeptor Sauerstoff übertragen. Die Hauptkomponenten dieses Prozesses sind die großen Transmembran-Proteinkomplexe (Komplexe I–IV) und die kleinen mobilen Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrom c. Die Komplexe I, III und IV etablieren hierbei einen elektrochemischen Protonengradienten über der Membran (dargestellt als graue Pfeile). Die ATP-Synthase (auch als Komplex V bezeichnet) nutzt diesen Gradienten zur Produktion von ATP. Die Darstellung basiert auf der Gestalt der Komplexe aus der Röntgenkristallographie bzw. Elektronenmikroskopie und ist aus [198] modifiziert entnommen. Bei Komplex I zeigt der gelbe Umriss die elektronenmikroskopische Struktur von Komplex-I-Einzelpartikeln aus *Yarrowia lipolytica* [199]. In diesem Umriss ist die gerade publizierte Kristallstruktur von Komplex I aus *Thermus thermophilus* intuitiv platziert [200].

Eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel aller Organismen spielt das Molekül Adenosintriphosphat (ATP). 1929 entdeckten K. Lohmann bzw. C.H. Fiske und Y. Subbarow ATP in Zellextrakten [201–203]. Zur Erklärung der Funktion als universeller Energieträger führte F. Lipmann (Nobelpreis in Physiologie und Medizin 1953) den Begriff der energiereichen Bindung ein [204]. Zwar setzen Organismen häufig ein Äquivalent ihrer eigenen Körpermasse pro Tag an ATP um, aber die „steady-state“-Menge ist deutlich geringer, beim Menschen ca. 50–200 g. Für die technische Gewinnung von ATP eignen sich alternative Wege, wie die von A.R. Todd entwickelte ATP-Totalsynthese (Nobelpreis für Chemie im Jahre 1957 [205, 206]). Um ATP für unterschiedliche Anwendungen verfügbar zu haben, bauen Organismen im Allgemeinen einen elektrochemischen Protonengradienten über einer Membran auf (wie bereits im Kapitel 3.1 erwähnt), der dann von der ATP-Synthase genutzt werden kann. In Eukaryonten sind die Mitochondrien bzw. die Chloroplasten die wichtigsten Zellorganellen für die ATP-Synthese. Daneben gibt es aber auch die sogenannten ektopen ATP-Synthasen auf der Zelloberfläche des Endothels. Da deren enzymatische Aktivität vor allem bei Tumor-typischen niedrigen pH-Werten hemmbar ist (durch Angiostatin), werden ektopen ATP-Synthasen als wichtiger Einsatzort bei der Behandlung von Tumoren angesehen [207]. Die Abbildung 3.6 verdeutlicht am Beispiel der Atmungskette in der inneren mitochondrialen Membran wie durch elektronentransportierende Proteinkomplexe der elektrochemische Protonengradient für die Synthese von ATP aufgebaut wird. In dieser Abbildung ist die Anordnung für die Proteinkomplexe gezeigt, wie sie auch in den Lehrbüchern zu finden ist: als isolierte Einzelkomplexe. Später wird als zweites Modell die Organisation als Superkomplexe vorgestellt, wobei hier durch räumliche Nähe eine direkte Übertragung von Substraten möglich ist (siehe Abb. 3.9(B)).

3.5.1 Die ATP-Synthase

Aufbau der ATP-Synthase

Als Anfang der 1960er Jahre isolierte Mitochondrien mittels Elektronenmikroskopie untersucht wurden, ließen sich sogenannte Elementarpartikel mit einem polyedrischen Kopf von 8–10 nm und zylindrischem Stamm identifizieren [208] (siehe Abbildung 3.7). Weitere Untersuchungen konnten schließlich zeigen, dass es sich hierbei um ATP-Synthasen handelt [209]. Die als Kopf bezeichnete Einheit ist der Subkomplex F_1 , in dem die Synthese von ATP stattfindet. Dieser Subkomplex ist wiederum aus mehreren Proteinuntereinheiten mit definierter Stöchiometrie aufgebaut. Je nach Organismus variiert die Bezeichnung der Untereinheiten (siehe Abb. 3.7). Abbildung 3.7 bezieht sich ebenso wie große Teile des nachfolgenden Ergebnisteils auf die Chloroplasten-ATP-Synthase bzw. die ATP-Synthase aus Cyanobakterien. Hierbei ist zu erkennen, dass die Untereinheiten von $(C)F_1$ mit griechischen Buchstaben nach abnehmender Masse bezeichnet sind. $(C)F_1$ lässt sich als hydrophiler Subkomplex von dem membran-integralen Bereich trennen, ist dann aber nicht mehr zur Synthese von ATP in der Lage, sondern kann nur noch ATP hydrolysieren. Der abgetrennte F_1 -Komplex kann deutlich einfacher charakterisiert werden als die fragile Gesamt-ATP-Synthase. Er lässt sich aus Chloroplasten durch EDTA-Behandlung bei niedrigen Ionenstärken isolieren [210], und das sogar in recht hohen Mengen (bis zu 400 mg aus 2 kg Spinat [211]). Bei F_1 aus Chloroplasten (CF_1) sind Kristallstrukturen mit einer Auflösung von ca. 0,32 nm bekannt [212, 213]. In diesen Strukturen sind die Untereinheiten α und β in jeweils drei Kopien vorhanden und γ sowie ϵ , die zum zentralen Stiel der ATP-Synthase gehören, jeweils einmal enthalten. Eine ähnliche Zusammensetzung findet man auch in den Strukturen der Rinderherz-ATP-Synthase [214], für deren Aufklärung 1997 der Nobelpreis für Chemie an J. E. Walker verliehen wurde.

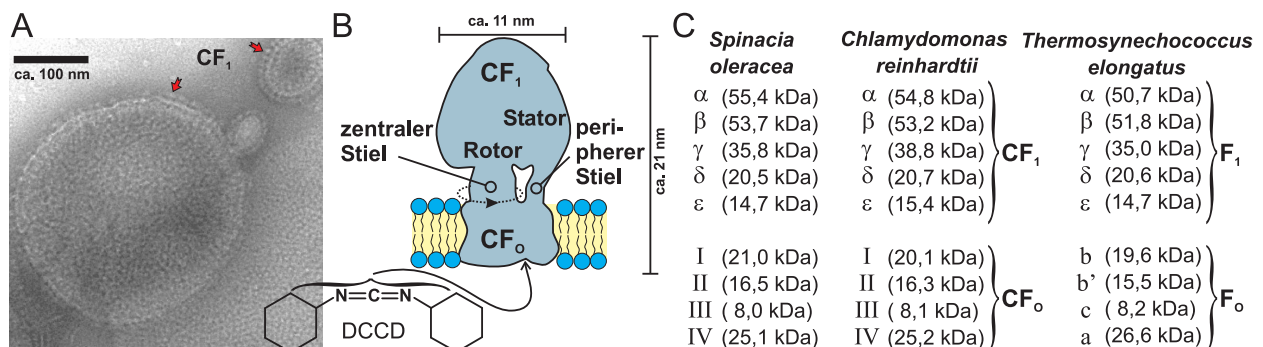


Abbildung 3.7: Aufbau der photosynthetischen ATP-Synthasen. Nach Negativkontrastierung lässt sich der CF_1 -Teil (Kopf) der ATP-Synthase mittels Elektronenmikroskopie identifizieren (A). Hierbei wurde die ATP-Synthase analog zu [178] in Liposomen mit Asolectin rekonstituiert (siehe auch Abb. 3.5). (B) zeigt schematisch die Unterteilung der ATP-Synthase in zwei Subkomplexe und die Hemmung mit dem Inhibitor Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD). Je nach Organismus variiert die Masse der Untereinheiten (C).

Im Gegensatz zu den Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\gamma$ des F_1 -Komplexes (siehe auch Abb. 3.8) ist die Strukturaufklärung der Untereinheiten des peripheren Stiels schwieriger. Die größten Probleme treten aber bei der Analyse der membranintegralen Untereinheiten auf. Da bislang noch keine Kristallisation einer vollständigen ATP-Synthase gelang, sind Informationen über Teilbereiche, wie für die hydrophilen Untereinheiten des peripheren Stiels der ATP-Synthase [215] bzw. für den fast vollständigen peripheren Stiel [216], sehr nützlich. Solche Teilinformationen mit hoher Auflösung lassen sich dann in größere Einzelpartikelstrukturen aus der Elektronenmikroskopie einfügen [217, 218]. Gerade für den membranintegralen F_0 -Bereich sind auch Strukturinformationen niedriger Auflösung sehr wichtig für das Verständnis der Funktion der ATP-Synthase. Während die im F_1 -Teil ablaufenden Konformationsänderungen während der Hydrolyse von ATP schon recht gut charakterisiert sind, fehlen viele Informationen über den Membranbereich.

Mechanismus der ATP-Bildung/-Hydrolyse

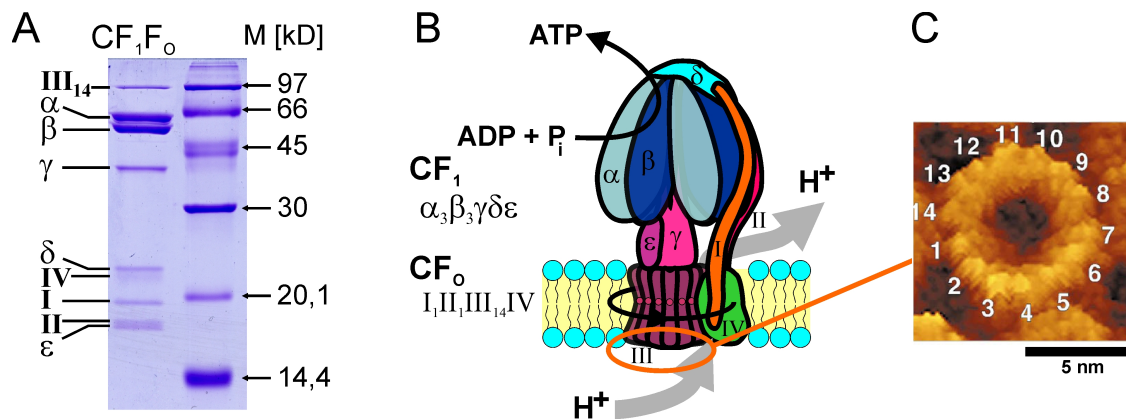


Abbildung 3.8: Untereinheiten der Chloroplasten-ATP-Synthase. CF_1F_0 ist aus neun verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, die sich mittels SDS-Gelelektrophorese trennen und identifizieren lassen (A). Je nach Probenvorbereitung erscheint Untereinheit III in denaturierenden Gelen als Oligomer (III_{14}) oder als Monomer. (B) zeigt schematisch den Aufbau der ATP-Synthase (modifiziert nach [219]). In (C) ist eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Protonenturbine III_{14} gezeigt (entnommen aus [220]).

Gemeinsam mit J. E. Walker erhielt 1997 auch P. D. Boyer den Nobelpreis. Sein Anteil war das Konzept, wie die ATP-Hydrolyse funktioniert und in der Umkehrung der Prozesse die Synthese – der Bindungswechsel-Mechanismus [221]. Die Grundlage des Konzepts ist, dass sich während der enzymatischen Aktivität die Bindungseigenschaften der ATP-Synthase-Untereinheiten ändern. Die entscheidende Untereinheit hierbei ist β , die nacheinander drei unterschiedliche Konformationen einnimmt. In der geschlossenen Konformation kann sich ATP spontan aus ADP und Phosphat bilden, so dass sich die Frage stellt, wodurch die Änderungen der Proteinstruktur hervorgerufen werden. Für diese Konformationsänderungen ist die Untereinheit γ (zusammen mit ϵ) ausschlaggebend. Wie in Abbildung 3.8 erkennbar, befindet sich γ als zentraler Stiel innerhalb der Untereinheiten $\alpha_3\beta_3$. Durch eine Vielzahl an Experimenten (zusammengefasst in [222]) konnte gezeigt werden, dass sich der zentrale Stiel relativ zu α und β dreht: er bildet den Rotor. Da die Drehachse aber eine konische Form aufweist, also verstärkt durch ϵ asymmetrisch ist, führt die Drehbewegung zu Konformationsänderungen bei α und β . Bei einer vollständigen Rotation bilden sich an den drei β -Untereinheiten auch drei Moleküle ATP.

Der Bindungswechsel-Mechanismus erklärt zwar die ATP-Bildung, aber es stellt sich als nächste Frage, was eigentlich die Triebkraft für die Drehung von γ und ϵ ist. Wenn man nur den F_1 -Teil der ATP-Synthase betrachtet, lässt sich dies schwerlich klären, dazu muss die Gesamtstruktur berücksichtigt werden, für Chloroplasten also CF_1F_0 . Der membranintegrale F_0 -Komplex besteht bei Chloroplasten und Cyanobakterien aus vier verschiedenen Untereinheiten (I-II-III-IV bzw. a-b-b'-c, siehe Abb. 3.7). Der Buchstabe „O“ in F_0 stammt aus dem Befund, dass in der mitochondriale ATP-Synthase die ATP-Hydrolyse durch den Inhibitor Oligomycin gehemmt werden kann [223]. Als entscheidende Komponente für die Drehung von γ und ϵ kommt bei Verlängerung der Drehachse in den Membranbereich die Untereinheit III/c ins Spiel. Diese Untereinheit ist ein Prototyp der sogenannten Proteolipide, also sehr hydrophober Proteine, die ähnlich den Lipiden durch Chloroform-Methanol-Mischungen extrahierbar sind [224].

γ und ϵ sind z.B. in *Ilyobacter tartaricus* sehr fest (Dissoziationskonstante von etwa 7,4 nM [225]) an Untereinheit c gebunden, so dass alle drei Untereinheiten gemeinsam den Rotor bilden und sich drehen. Allerdings kommt die Untereinheit III/c nicht nur in einer Kopie im Gesamtkomplex vor, sondern bildet ein Homooligomer. Dieses Oligomer rotiert als Gesamtheit – auch dies konnte mittlerweile nachgewiesen werden [226, 227]. Die Triebkraft für die Rotation des Oligomers III_x/c_x ist der elektrochemische Protonengradient. Durch Inhibitorstudien mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) ließ sich der entscheidende Zusammenhang zwischen Untereinheit III/c und dem Protonenfluss feststellen (siehe Abbildung 3.7). Bei Spinatchloroplasten, deren CF_1 -Teile durch EDTA-Behandlung entfernt worden waren, wurde ein be-

obachtetes Protonenleck mit DCCD verschlossen [228]. Für Rinderherz konnte als Zielprotein der DCCD-Behandlung eine Untereinheit der ATP-Synthase mit geringer Masse identifiziert werden [229]. Später stand auch für Spinat fest, dass das DCCD-bindende Protein die Untereinheit III der Chloroplasten-ATP-Synthase ist, welche auch Protonen bindet [230]. Als entscheidende Aminosäure sowohl für die DCCD- als auch für die Protonenbindung fungiert in CF₀ aus Spinat der mitten im hydrophoben Bereich der Membran gelegene Glutamat-Rest Glu-61 [231].

Da pro Untereinheit III/c genau ein Proton bindet, werden mit einer kompletten Umdrehung eines Oligomers bestehend aus x Untereinheiten III/c auch x Protonen bewegt [232]. Für die Chloroplasten-ATP-Synthase ist beschrieben, dass für den Protonentransport über die Membran die Anwesenheit des Oligomers III_x und der Untereinheit IV erforderlich sind [211]. Zur Funktionsweise von F₀, dem Zusammenwirken von III_x/c_x mit IV/a, erarbeitete W. Junge ein Modell [233], das später detaillierter dargestellt wurde [234, 235]. Untereinheit IV/a stellt die Protonenzugangs- sowie Protonenauslasskanäle zur Verfügung. Von der einen Seite der Membran ausgehend wird Untereinheit III/c mit Protonen versorgt, die Abgabe erfolgt auf der gegenüberliegenden Seite [236, 237]. Nach dem aktuellen Modell [238] rotiert die Protonenturbine III_x/c_x durch Brown'sche Molekularbewegung ständig vorwärts und rückwärts innerhalb der Membranebene. Wenn Glutamat 61 protoniert ist, lässt sich die zugehörige Untereinheit III leichter im hydrophoben Inneren der Membran bewegen als bei III mit negativ-geladener Aminosäure. So entsteht durch die Protonierung eine Vorzugsrichtung. Bei einer vollständigen Rotation der Protonenturbine III_x/c_x bewegt sich die am Zugangskanal protonierte Untereinheit III/c solange durch die Membran, bis sie in die Nähe des Protonenauslasskanals von IV/a kommt. Von dort aus werden die an III gebundenen Protonen wieder abgegeben, und Glu-61 steht für die erneute Protonierung am Zugangskanal von IV zur Verfügung.

Bedeutung der Protonen-transportierenden Untereinheiten

Wenn die Umwandlung des elektrochemischen Protonengradienten in chemische Energie bilanziert wird, ergibt sich bei der Rotation des Oligomer III_x/c_x um 360°, dass x Protonen für die Synthese von drei ATP-Molekülen genutzt werden. Die Anzahl an Protonen pro ATP, das sogenannte Kopplungsverhältnis, ist ein wichtiger Wert zur Einschätzung der energetischen Effizienz von ATP-Synthasen sowie aller vorgelagerter Prozesse (Atmungskette oder Photosynthese) [239]. Für Mitochondrien lagen die zunächst von P. Mitchell beschriebenen H⁺/ATP-Verhältnisse bei 2 [240]. Nachfolgende Untersuchungen ergaben unterschiedliche Werte zwischen 2 und 3,8 für Mitochondrien, bei Chloroplasten zwischen 2 und 5 [241]. Die Angaben in Lehrbüchern waren meist ganzzahlig, bei 3 oder 4, woraus eine Anzahl von 9 oder 12 Untereinheiten c gefolgert werden. Durch Fortschritte in der Isolierung und Strukturaufklärung gelang mittlerweile die Ermittlung der Stöchiometrie von Oligomeren aus verschiedenen Organismen. So standen zu Beginn dieser Arbeit (Jahr 2000) für Hefe-Mitochondrien 10 Untereinheiten [242] und für Spinat-Chloroplasten 14 Untereinheiten [220] fest. Entgegen der Tendenz zu der durch drei teilbaren Anzahl von 9 oder 12 Untereinheiten [243], ergibt sich aus den gefundenen Werten eine „Fehlanpassung der Symmetrie“ mit 10 H⁺/3 ATP (Hefe-Mitochondrien) bzw. 14 H⁺/3 ATP (Spinat-Chloroplasten). Außerdem haben nicht alle ATP-Synthasen die gleiche Anzahl an Untereinheiten im Oligomer, sondern es liegt eine große Bandbreite vor.

Ein zentrales Thema, das aktuell von vielen Forschern bearbeitet wird, ist die Suche nach der Ursache und Auswirkung der unterschiedlichen Stöchiometrien von c-Untereinheiten im Oligomer [244]. Die Information über die Stöchiometrie kann beispielsweise genetisch verankert sein, so dass in besonderen Fällen das komplette Oligomer als eine Gensequenz kodiert ist, wie für das Archaeon *Methanopyrus kandleri* gezeigt [245]. Es wird diskutiert, dass Chaperone bei der Assemblierung des Oligomers behilflich sind [246, 247]. Die Form einer einzelnen Untereinheit c könnte aber auch die Größe des vollständigen Oligomers festlegen, was die Selbstzusammensetzung der zylinderartigen Oligomere erleichtert [248]. Wenn nun die Stöchiometrie nicht starr fixiert ist, kann sich der metabolische Zustand auf die Anzahl an Untereinheiten im Oligomer auswirken [249, 250]. Die eigenen Untersuchungen zu den letzten zwei

Aspekten (im Abschnitt 4.2.2 ab Seite 42) belegen, dass die Form des Monomers entscheiden für die Oligomer-Stöchiometrie ist und der metabolische Zustand keinen Einfluss auf die Stöchiometrie hat.

Das Interesse am membranintegralen Bereich der ATP-Synthase wird mittlerweile auch durch die Forschung der pharmazeutischen Industrie verstärkt, die hier einen Ansatz zur Entwicklung neuer Wirkstoffe sieht [251]. Dabei stehen sowohl eher seltene vererbte Stoffwechselkrankheiten als auch weitverbreitete Infektionserkrankungen im Fokus. Ein Beispiel für den ersten Punkt sind bestimmte lysosomale Speicherkrankheiten, die autosomal-rezessiv vererbt werden. Unter dem Überbegriff der sogenannten neuronalen Ceroid-Lipofuszinose sind genetisch verschiedene neurodegenerative Erkrankungen zusammen gefasst, im Englischen mit der Bezeichnung „Batten disease“ [252, 253]). In den USA und skandinavischen Ländern sind hiervon etwa 1 von 12.500 Lebendgeburten betroffen, weltweit 1 von 100.000 [254]. Ein wichtiges Merkmal dieser Erkrankung sind Ablagerungen von Lipopigmenten, die zum großen Teil aus der Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase bestehen [255]. Die Patienten besitzen einen durch posttranslationale Modifizierung dreifach methylierten Lysin-Rest in der Untereinheit c, dessen Ursachen und Auswirkungen noch nicht geklärt werden konnten [256]. Für die Wirkstoff-Forschung im Bereich von weitverbreiteten Erkrankungen durch pathogene Erreger ist es entscheidend, dass die Aminosäuresequenzen der Untereinheiten a bzw. c von Säugetieren zwar sehr ähnlich sind, sich aber deutlich von den Sequenzen in Mikroorganismen unterscheiden. Aufgrund der starken Konservierung besteht die Hoffnung, dass Medikamente entwickelt werden können, die spezifisch an die Untereinheiten a/c pathogener Bakterien binden, aber nicht an die humanen Analoga [257]. Eine wichtige Anwendung betrifft die Tuberkulose, deren Erreger Mycobakterien sind, die etwa ein Drittel der Weltbevölkerung infiziert haben. Erste Ergebnisse zeigten, dass Diarylchinoline selektiv die mycobakteriellen ATP-Synthasen ausschalten können [258]. Mittlerweile steht auch fest, dass das Zielprotein der Behandlung die Untereinheit c der Mycobakterien ist [259, 260]. Solche neuen Ansatzpunkte sind vor allem deshalb wichtig, da mittlerweile einige Formen des Tuberkulose-Erregers gegen die meisten aktuell verwendeten Antibiotika resistent sind [261].

Die beiden Stiele der ATP-Synthase

Während der membranintegrale F_0 -Komplex für die Umwandlung des Protonengradienten in die Rotationsbewegung zuständig ist, findet die Regulation der ATP-Synthase hauptsächlich in F_1 statt [262]. Das zentrale Problem, das hierbei gelöst werden muss, ist die genaue Steuerung der beiden enzymatischen Aktivitäten der ATP-Synthase. Im Normalfall synthetisiert F_1F_0 ATP, und nur in Ausnahmefällen kann es notwendig sein, den Enzymkomplex auf die ATP-Hydrolyse umzustellen. Die Umschaltung vom Synthese- in den Hydrolysemodus erfolgt dabei nicht nur durch Umkehr der Rotationsrichtung, sondern geht mit weiteren Konformationsänderungen einher [263]. Für thermophile Bakterien konnte als wichtiger Modulator für die ATP-Hydrolyse-Aktivität die ATP-Konzentration identifiziert werden, die nicht nur die Untereinheiten α und β beeinflusst sondern auch γ - ϵ [264]. Ein wichtiger Schalter vieler Organismen ist die Untereinheit ϵ , was sich bei Chloroplasten dadurch bemerkbar macht, dass die ATP-Hydrolyse dann ermöglicht wird, wenn ϵ von CF_1 abgetrennt wird [265, 266]. Der Carboxy-terminale Bereich von ϵ besteht aus zwei α -Helices, die entweder nahe beieinander eine Haarnadelschleife bilden [267, 268] oder eine langgestreckte Konformation einnehmen können [269]. Bei der Konformationsänderung kommt es zu keinen Auswirkungen auf die ATP-Synthase-Aktivität, stattdessen blockiert die gestreckte Konformation die ATP-Hydrolyse [270]. Ausschlaggebend für die Konformation von ϵ ist neben der ATP-Konzentration auch die Protonenmotorische Kraft [271].

Wenn nur wenig Licht für die Photosynthese zur Verfügung steht, wird in Pflanzen auch nur wenig ATP durch die Chloroplasten-ATP-Synthase hergestellt. Da dieser Energieträger für viele weitere metabolische Prozesse benötigt wird, darf ATP nicht durch Hydrolyse in einem als ATPase arbeitendem CF_1F_0 -Komplex unnötig verbraucht werden [272]. Ein auf Chloroplasten beschränkter Regulationsmechanismus zum Einschränken der Hydrolyse von ATP basiert auf der Ausbildung bzw. Spaltung einer Disulfidbrücke. So konnte für die ATP-Synthase aus Spinat zwar die Synthese von ATP ermittelt werden, die Messung der ATP-Hydrolyse war aber erst möglich, nachdem Chloroplasten bei hohen Lichtinten-

sitäten mit hohen Konzentrationen an Reduktionsmitteln behandelt wurden [273]. Von diesen Untersuchungen ausgehend dauerte es fast zwanzig Jahre, bis zwei Cystein-Reste in der γ -Untereinheit von CF_1 als entscheidendes Element für die Aktivierung der Hydrolyse-Aktivität identifiziert werden konnte [274, 275]. Diese Cystein-Reste wiederum befinden sich in einem Abschnitt aus vierzig Aminosäuren, der stark mit ϵ wechselwirkt und weder in Mitochondrien noch in (nichtphotosynthetischen) Bakterien zu finden ist [276]. So sind γ und ϵ sowohl in räumlicher Nähe als auch funktionell verbunden, so dass erst durch das Umlegen zweier Schalter die Umstellung von einer latenten ATPase in den ATP-Hydrolyse-Modus erfolgt [277, 278]. Im Gegensatz zu den Chloroplasten fehlt in den meisten Cyanobakterien (z.B. bei *Synechococcus*) die Redox-Aktivierbarkeit der Untereinheit γ [279], mit Ausnahme des alkaliphilen *Spirulina platensis* [280].

Neben dem Rotor als zentraler Stiel der ATP-Synthase gibt es als zweite Verbindung zwischen F_1 und F_0 den peripheren Stiel [281]. Dieser zweite Stiel dient als Klammer zwischen der Untereinheit IV/a in F_0 und der an α und β fixierten Untereinheit δ [282]. Das Heterodimer I-II/b-b' von photosynthetischen Organismen bzw. Homodimer b_2 in vielen Bakterien fungiert aber nicht nur als reines Verbindungselement, sondern ist durch seine Elastizität auch funktionell wichtig [232]. Diese Untereinheiten des peripheren Stiels weisen im Gegensatz zu anderen Untereinheiten der ATP-Synthase eine hohe Toleranz hinsichtlich ihrer Aminosäure-Zusammensetzung und sogar Polypeptidkettenlänge auf [283]. Sie bilden zwar eine dimere Struktur, sind aber nicht wie ein Bündel Stäbe exakt parallel aneinander gelagert, sondern versetzt zueinander [284]. Nur einige Bereiche der Untereinheiten sind sehr empfindlich gegenüber Veränderungen. Dazu gehören neben dem Carboxy-terminalen Bereich auch ein membranintegrales Segment [285]. In Mitochondrien ist der periphere Stiel aus nur einer b-Untereinheit, aber zusätzlich aus anderen Proteinen aufgebaut [217]. Während diese mitochondrialen Untereinheiten ebenfalls als elastische Verbindung zwischen F_1 und F_0 dienen, konnte als weitere Funktion eine Beteiligung an der Ausbildung von supramolekularen Komplexen der ATP-Synthase nachgewiesen werden [286].

3.5.2 Superkomplexe von energiewandelnden Membranproteinen

Rolle der ATP-Synthase-Untereinheiten bei der Bildung von Dimeren

Als Ende der 1980er Jahre Mitochondrien des zu den „Pantoffeltierchen“ gehörenden Ciliaten *Paramecium multimicronucleatum* durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie untersucht wurden, fand man ca. 9 nm große, nicht-zufällig auf den Cristae verteilte Strukturen ([58], siehe Abb. 3.9). Bei diesen Strukturen wurde vermutet, dass es sich um den F_1 -Teil der mitochondrialen ATP-Synthase handelt, der in Zweierreihen auf den helikal-gewundenen Cristae-Tubuli zu finden ist [58, 287]. Etwa zehn Jahre danach konnten Dimere der ATP-Synthase aus Hefe-Mitochondrien nach einer Solubilisierung mit Digitonin (bzw. geringen Mengen Triton X-100) über die blau-native Elektrophorese nachgewiesen werden [288] (zur Methode siehe S. 27). Darüber hinaus lassen sich mittels blau-native Elektrophorese [289], vor allem aber mit der farblosen Variante hiervon [290, 291], auch Oligomere mit mehr als zwei F_1F_0 feststellen.

Eine Analyse der Zusammensetzung des Dimers ergab, dass dieses drei zusätzliche Untereinheiten (in Hefe e, g und k) enthält, und der Kontakt zwischen den Monomeren vermutlich über den F_0 -Bereich der ATP-Synthase hergestellt wird [288]. Wenig später wurde allerdings gefunden, dass das an den F_1 -Teil der mitochondrialen ATP-Synthase gebundene Inhibitor-Protein IF_1 bei der Bildung der Dimere erforderlich sein sollte [293]. Während für die photosynthetischen ATP-Synthasen die ATP-Hydrolyse wie zuvor beschrieben durch Zusammenwirken der Untereinheiten γ und ϵ eingeschränkt wird, ist in Mitochondrien das zusätzliche Protein IF_1 von entscheidender Bedeutung [294]. Zwei IF_1 -Proteine bilden sehr leicht ein Homodimer [295] und binden nur während der ATP-Hydrolyse an F_1F_0 [296]. Dies führt dazu, dass zum Beispiel bei Sauerstoffmangel (Hypoxie) der Verbrauch von ATP durch eine in umgekehrter Richtung arbeitende ATP-Synthase sehr schnell unterbunden werden kann. Eine zusätzliche Funktion übernimmt IF_1 bei der Regulation des Volumens der Mitochondrien [297]. Mittlerweile gibt es Hinweise, dass mit

Oligomerisierung hat. Häufig aufgeführte Vorteile der supramolekularen Organisation sind eine höhere Proteinstabilität, das gerichtete Weiterleiten (instabiler) Substrate oder die Regulation der Aktivität von Enzymkomplexen. Ein charakteristisches Merkmal der Mitochondrien ist, dass ihre innere Membran zum Matrix-Raum vielfach aufgefaltet ist, und sie durch diese Cristae-Strukturen eine sehr große Membranoberfläche besitzen (siehe Abb. 3.9). Zwar sind Lipide sehr wichtig bei der Bildung unterschiedlicher Membranstrukturen, aber auch Membranproteine können eine Krümmung von Membranen verursachen [306]. Während Wildtyp-Hefezellen normale Cristae-Strukturen aufweisen, verändert sich die Morphologie deutlich wenn die Dimer-Untereinheiten e und g deletiert werden [289]. Hierbei bilden sich Zwiebelschalen-ähnliche Strukturen, so dass eine Verbindung zwischen der Bildung von ATP-Synthase-Dimeren mit der strukturellen Organisation der Cristae vermutet wird [289, 307]. Nicht nur eine komplette Deletion verändert die Cristae-Morphologie, durch Variation der Mengen an Untereinheiten e und g findet eine Modulation der Membranstruktur statt [308]. Dabei scheint es wichtig zu sein, dass die Dimerbildung flexibel reguliert werden kann, denn eine starre Quervernetzung von ATP-Synthasen eliminiert die Cristae [309].

Allerdings ist nicht nur die ATP-Synthase für die Steuerung der Cristae-Morphologie verantwortlich. So wirken bei der Bildung der Cristae die ATP-Synthase-Untereinheiten e und g antagonistisch zu dem Protein Fcj1, welches sich zwischen einzelne F_1F_0 schiebt und so für einen größeren Abstand zwischen den Monomeren sorgt [310]. Fcj1 ist ein Protein, das in der Verbindungsstelle von der inneren Mitochondrienmembran zu den Cristae (Cristae-Junction) angereichert vorliegt. Weiterhin kommt dem Protein Mitophilin eine wichtige Rolle bei der Bildung der Cristae-Morphologie zu [311]. Die ATP-Synthase-Proteine, Fcj1 und Mitophilin bilden dabei wohl einen gemeinsamen Weg für die Erhaltung der Form von Mitochondrien [312]. Der zweite (davon unabhängige) Weg läuft über Prohibitin und die Proteine OPA und Mgm1p [312]. Im Zusammenhang mit den Mitochondrien sind Prohibitine sehr wichtige Proteine, die auch größere homooligomere Komplexe bilden können. Prohibitin wirkt als Faltungshelfer für die Atmungskettenkomplexe, reguliert den Zellzyklus und ist wie eben erwähnt wichtig für die Cristae-Morphologie [313, 314].

Neben dem Einfluss auf die Mitochondrienstruktur hat der Oligomerisierungszustand der ATP-Synthase auch Auswirkungen auf die Funktion und Stabilität. So gibt es Hinweise, dass in Rinderherz-Mitochondrien die Dimerisierung zu einer höheren Stabilität von F_1F_0 sowie einer effizienteren Synthese von ATP führt [315]. Einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität hat dabei das Inhibitorprotein IF₁ [316]. Wie bei vielen genau einzustellenden Stoffwechselwegen dient auch für die Bildung von ATP-Synthase Dimeren die An-/Abwesenheit einer Phosphatgruppe an z.B. Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten als wichtiger Schalter. Dass durch die Dimerisierung die Funktion der ATP-Synthase reguliert werden kann, legt die Position einer wichtigen Phosphorylierungsstelle nahe, die im zentralen Stiel liegt. So ist beim ATP-Synthase-Monomer aus Rind ein bestimmter Tyrosin-Rest in der γ -Untereinheit (Tyr52) phosphoryliert, bei Untereinheit γ des Dimers aber nicht [317]. In ähnlicher Weise ist in Hefe beim F_1F_0 -Monomer ein bestimmter Serin-Rest der Dimerisierungs-Untereinheit g (Ser62) in phosphorylierter Form zu finden [318]. Wenn diese Aminosäure aber durch Alanin ersetzt wird, also keine Phosphorylierung mehr möglich ist, erhöht sich der Dimer-Anteil deutlich [318]. Durch Aminosäure-Austausch lassen sich auch die funktionellen Konsequenzen einer geänderten Dimerisierung der ATP-Synthase nachweisen. Wenn die Dimer-spezifischen Untereinheiten e und g so verändert werden, dass weniger F_1F_0 -Dimere in nativen Gelen identifiziert werden können, ergeben sich daraus zunächst keine Auswirkungen auf die Cristae-Morphologie [319]. Aber das Membranpotenzial der Hefemitochondrien mit veränderten Untereinheiten sinkt in Abhängigkeit von der Abnahme an ATP-Synthase-Dimeren [319]. In der bisherigen Beschreibung von ATP-Synthase-Dimeren ist bisher nur mitochondriales F_1F_0 erwähnt. Der Grund dafür liegt darin, dass zu Beginn dieser Arbeit weder bei Bakterien noch in Chloroplasten ein Dimer bekannt war. Es gibt sogar die 2002 aufgestellte Vermutung, der dimere Zustand sei spezifisch für Mitochondrien und komme sonst nicht vor [60].

Wechselwirkung von ATP-Synthasen mit anderen Proteinen

Neben der Interaktion von ATP-Synthasen miteinander, existiert auch ein vielfältiges Netzwerk an weiteren Protein-Protein-Wechselwirkungen. Zu einigen mit der ATP-Synthase wechselwirkenden Proteinen findet noch eine Diskussion statt, ob sie wirklich zur ATP-Synthase gehören oder die gemeinsame Anwesenheit in den Proben nur auf Verunreinigungen beruht. So spielt für die Erhaltung der protonenmotorischen Kraft der noch umstrittene „Faktor B“ eine wichtige Rolle [320]. Die Struktur dieses Proteins ist zwar bekannt [321], aber seine Funktion ist noch unklar. Eine mögliche Funktion könnte die Unterstützung der ATP-Synthase-Dimere unter Bedingungen eines sehr geringen pH-Gradienten sein [322]. Zusätzlich wird hierbei diskutiert, dass Faktor B als entscheidendes Element der Oligomerisierung auch zur Bildung der Cristae-Strukturen in Mitochondrien beiträgt [323].

Für bestimmte Protein-Protein-Wechselwirkungen muss nicht unbedingt die komplette ATP-Synthase mit anderen Proteinen interagieren, manchmal können einzelne Untereinheiten auch separat in einem anderen Kontext wiedergefunden werden. Ein Beispiel hierfür ist die sogenannte mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore. Unter Bedingungen mit erhöhten Phosphatkonzentrationen bzw. Abreicherung an Nukleotiden öffnen sich diese unspezifischen Poren und lassen Moleküle bis zu 1500 g/mol durch die innere mitochondriale Membran passieren [324]. Da auch Protonen durch die Poren hindurch treten, wird die Oxidative Phosphorylierung entkoppelt und als Resultat kann der Zelltod durch Nekrose erfolgen [325]. Wenn bei einer verminderten Durchblutung von Organen (Ischämie) zunächst ATP weitgehend abgebaut wird, öffnen sich die Poren und die Entkopplung findet statt. Nach Wiederherstellen der normalen Durchblutung können dann Reperfusionsschäden auftreten. Ein wichtiges Signalmolekül für das Öffnen ist Calcium, durch welches auch die Dephosphorylierung der c-Untereinheit der ATP-Synthase gesteuert wird [326, 327]. Es wird eine Wechselwirkung dieser Untereinheit mit der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore, bzw. die Beteiligung bei der Bildung der Pore vermutet [326, 328].

Eine entscheidende Rolle haben Protein-Protein-Interaktionen bei der Steuerung der ATP-Produktion und des Sauerstoff-Verbrauchs in den Mitochondrien. So müssen unter variierenden Bedingungen die Substratflüsse koordiniert werden. Als wichtige Komponente für den Sauerstoff-Verbrauch fungiert die Cytochrom-c-Oxidase (siehe Abb. 3.6). Für den Austausch von Phosphat, Protonen sowie ATP und ADP über die Membran sind Transportproteine verantwortlich. Die Cytochrom-c-Oxidase scheint das wesentliche Kontrollelement des ATP-Metabolismus zu sein, mit einer nachgeschalteten Regulation durch den Phosphat-Protonen-Austausch [329]. Ob diese Steuerung aber kinetisch [329] oder durch physischen Kontakt der Protein(komplex)e [330] erfolgt, ist noch immer nicht endgültig geklärt.

Die ATP-Synthase braucht, um optimal arbeiten zu können, zusätzlich zum elektrochemischen Protonengradienten eine ausreichende Versorgung mit ihren Substraten ADP und Phosphat. Beide Substanzen werden durch die Membran hindurch zum F_1F_0 -Komplex transportiert, mit Hilfe des Adeninnukleotid-Carriers und des Phosphat-Carriers. Der Adeninnukleotid-Carrier ist in hohen Mengen in den Mitochondrien vorhanden und wird daher häufig als Kontamination zusammen mit anderen mitochondrialen Proteinen gefunden. So gab es schon Mitte der 1970er Jahre Hinweise auf benachbarte Lokalisierung des ADP/ATP-Carriers mit dem F_1 -Teil [331]. In Rinderherz-Präparationen befindet sich der Carrier zusammen mit der ATP-Synthase in der gleichen Dichtegradienten-Fraktion [332]. Dies muss aber nicht zwangsläufig einen direkten Protein-Protein-Kontakt bedeuten. So vergingen nach solchen ersten Hinweisen etliche Jahre, bis die Isolierungsvorschrift optimiert war, um ATP-Synthase-Komplexe mit Transportproteinen zu identifizieren. Wenn nun Mitochondrien aus Rattenherzen zu Cristae-ähnlichen Vesikeln fraktioniert werden, kann aus diesen das sogenannte „ATP-Synthasom“ extrahiert werden [333]. Hierbei handelt es sich um einen Superkomplex der ATP-Synthase mit dem Adeninnukleotid- und dem Phosphat-Carrier. Interessanterweise sind beide Carrier auch am Aufbau der oben erwähnten mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore beteiligt [324]. Voraussetzung für die Isolierung ist aber die Wahl eines geeigneten Detergens, so erhält man z.B. nur mit Tridecylmaltosid das ATP-Synthasom, nicht aber mit DDM. In diesem Superkomplex sind die beiden Carrier als Heterodimer benachbart zur Untereinheit c im F_0 -Teil der ATP-Synthase angeordnet, wie eine Einzelpartikelanalyse an negativ-kontrastierten

Elektronenmikroskopie-Proben zeigte [334]. Eine derartige Assoziation kommt nicht nur bei Ratten sondern auch in Rinderherz-Mitochondrien vor [335].

Eine noch größere Verbreitung von ATP-Synthasom-Strukturen bei Eukaryonten legt eine Studie nahe, bei der Mitochondrien aus Leishmanien untersucht wurden. Leishmanien sind Protozoen und leben als intrazelluläre Parasiten in Insekten und Wirbeltieren. Auch aus solchen Organismen kann (durch Dichtegradienten-Zentrifugation) ein Komplex aus der ATP-Synthase und dem Adeninnucleotid-Translokator (der oben erwähnte Carrier) isoliert werden [336]. Das ATP-Synthasom ermöglicht eine Optimierung der ATP-Synthese, indem die Substrate gezielt in die Umgebung des katalytischen Zentrums in F_1 gebracht werden. Zugleich wird ebenfalls mit dem Adeninnukleotid-Carrier gerade gebildetes ATP von diesem Zentrum weg transportiert, um eine Beeinträchtigung der ATP-Synthese bzw. die Umkehrreaktion der Hydrolyse zu verhindern. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass das ATP-Synthasom Bestandteil eines noch größeren Komplexes ist, zu dem auch die Succinat-Dehydrogenase und ein ABC(ATP-Bindungs-Kassetten)-Transporter gehören [337]. Außerdem scheint das ATP-Synthasom über die Creatinkinase des mitochondrialen Intermembranraums einen Kontakt zur äußeren Mitochondrienmembran zu haben, und zwar zu dem spannungsabhängigen Anionenkanal VDAC und Tubulinen [338].

Ebenso wie durch Kopplung mit Carriern der Transport von Metaboliten effizienter wird, ist auch eine Verbesserung des Protonentransports zur ATP-Synthase sinnvoll. Dies kann dadurch realisiert werden, dass die protonentransportierenden Komplexe der Atmungskette in räumliche Nähe zum F_1F_0 -Komplex angeordnet werden, oder durch einen effizienteren Protonentransport entlang von Membranen [339]. Ein stabiler Superkomplex mit Atmungskettenkomplexen und der ATP-Synthase ist bisher zwar noch nicht isoliert worden, aber es gibt etliche Hinweise auf eine Interaktion von F_1F_0 mit der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV). So konnte schon 1986 festgestellt werden, dass der Einbau des Proteolipids Untereinheit 9 aus Hefe (homolog zu c bzw. III) in die mitochondriale ATP-Synthase die Assemblierung der Cytochrom-c-Oxidase beeinflusst [340]. Wenn aber Hefe- F_1F_0 verändert wird, indem die Region zur Redox-Regulation von Chloroplasten in die γ -Untereinheit eingebaut wird, sinkt die Aktivität von Komplex IV um 90% [341]. Für einen korrekten Ablauf des Protonentransports sollten also beide Komplexe intakt vorliegen. Die direkte Steuerung ist auch daran erkennbar, dass die Biogenese von Komplex IV nur dann korrekt abläuft, wenn die ATP-Synthase vollständig assembliert und zur Protonentranslokation in der Lage ist [342]. Mit diesem Regulationsmechanismus lassen sich die Mengen des Protonendonors und -akzeptors genau aufeinander abstimmen.

Außerdem ist für die Wechselwirkung mit Komplex IV die ATP-Synthase-Untereinheit g wichtig. So war bei einer Deletion dieses Protein in Hefe nicht nur die ATP-Herstellung verringert, auch die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase reduzierte sich deutlich [330]. Neben Untereinheit g wirkt sich auch die ebenfalls bei der Dimerisierung der ATP-Synthase entscheidende Untereinheit e auf Komplex IV aus. Für die maximale Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität müssen sowohl Untereinheit g als auch e vorhanden sein [343]. Da, wie anschließend erläutert, Komplex IV nicht nur getrennt von anderen Atmungskettenkomplexen vorkommt, sondern häufig als Superkomplex, kann die ATP-Synthase auch auf die Funktion/Assemblierung dieser Komplexe einwirken. Wenn in Hefe beide Untereinheiten e und g deletiert sind, verändert sich zusätzlich zur Komplex-IV-Aktivität die Stöchiometrie der Superkomplexe aus Komplex III und IV. So liegt bei Hefe-Mutanten ohne e und g mehr freier Cytochrom- bc_1 -Komplex und weniger III-IV-Superkomplex (als 1000-kDa-Bande in nativen Gelen) vor [343]. Eine direkte Interaktion der ATP-Synthase mit dem Cytochrom- bc_1 -Komplex findet aber wohl nicht statt. Als Beleg hierfür zeigen kalorimetrische Messungen und die Elektronenspinresonanz zwar eine Wechselwirkung zwischen der ATP-Synthase und der Cytochrom-c-Oxidase, nicht aber mit Cytochrom bc_1 [344]. Die Wechselwirkung der ATP-Synthase mit Komplex IV ist aber nicht nur bei der Atmungskette in Mitochondrien zu beobachten. So z.B. sind in den Elektronentransportketten von aeroben Bakterien ähnliche Enzyme wie die Cytochrom-c-Oxidase zu finden, allerdings mit modifizierten Kofaktoren. In Cyanobakterien findet eine wechselseitige Steuerung der Aktivität der ATP-Synthase mit dem Cytochrom-b-563/c-554-Komplex statt [345]. Bei alkaliphilen Bakterien scheint eine 1:1-Wechselwirkung von F_1F_0 mit dem Cytochrom- caa_3 -Komplex die Voraussetzung für die ATP-Synthase bei sehr niedriger protonenmotorischer Kraft zu sein [346].

Superkomplexe der Oxidativen Phosphorylierung

Auf die Erforschung der Atmungskette, ebenso wie der Photosynthese, haben sich aufgrund ihrer fundamentalen Bedeutung viele Wissenschaftler konzentriert. Nach ersten Erfolgen in der Isolierung von einzelnen Komponenten der mitochondrialen Atmungskette (z.B. [347]) entwickelte sich zunächst die Idee, welche Proteinkomplexe, also die Komplexe I–V, die oxidative Phosphorylierung bewerkstelligen. Mit diesen Ergebnissen entstand in den 1950er Jahren das Modell, dass diese Proteinkomplexe als eine Einheit zusammenarbeiten [77], das klassische „Solid-state“-Modell [348]. In der nachfolgenden Zeit gelang es, immer reinere Präparationen der Atmungskettenkomplexe zu erhalten. Durch Elektrophorese wurden die Untereinheiten dieser Komplexe untersucht, Messungen der enzymatischen Aktivität vorgenommen und weitere Analysen durchgeführt [349]. Die sehr umfangreiche Charakterisierung zeigte, dass in den Präparationen individuelle Atmungskettenkomplexe vorlagen. Außerdem mehrten sich die Hinweise auf eine voneinander unabhängige Diffusion der Atmungskettenkomplexe: „Random Collision“ [350, 351]. Im Rahmen des allgemein akzeptierten Modells von Singer und Nicolson (siehe Abschnitt 3.1), bewegten sich die einzelnen Proteinkomplexe also frei in der Lipidmembran. Diese Vorstellung wurde schließlich auch von den meisten Lehrbüchern übernommen und ist auch heutzutage noch von vielen Wissenschaftlern, die im Bereich der Bioenergetik arbeiten, akzeptiert. Neben der Befunden der biochemischen Charakterisierung einzelner Atmungskettenkomplexe bezieht sich eine wichtige Grundlage des Random-Collision-Modells auf das Verhalten des membranintegralen Elektronenüberträgers Ubichinon als sogenannter Ubichinon-Pool [352]. Durch diese Ergebnisse wurde aber auch die wissenschaftliche Diskussion angekurbelt und beide Modelle gegenüber gestellt [353]. Die reale Situation in der lebenden Zelle könnte aber auch zwischen beiden Varianten liegen, so dass ein Umschalten vom Verhalten als individuelle Komplexe zu solchem als große Einheit möglich ist [354]. Die Diskussion nach der Interpretation von Ergebnissen an isolierten Systemen in Hinblick auf die realen Bedingungen in Organismen ist aber noch nicht abgeschlossen [355].

Für die Sichtweise, dass die Atmungskette funktionell zusammengehört, sprechen verschiedene Messungen, die spezifische Wechselwirkungen zwischen individuellen Komplexen aufzeigen (siehe Abb. 3.9). Die Atmungskette der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* enthält zwar keinen Komplex I, aber kinetische Analysen weisen darauf hin, dass sie als eine Einheit funktioniert [356]. In Rinderherzmitochondrien können die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase und Cytochrom bc_1 als gemeinsamer Komplex isoliert werden [357] und fügen sich sogar als eine Einheit zusammen, wenn man die individuellen Spezies mischt [358]. Solche Strukturen aus den Komplexen I und III bilden sich spezifisch in exakt definierter Stöchiometrie [359, 360]. Auch die Menge an Cytochrom-c-Oxidase scheint von den Anteilen an Komplex I und III abzuhängen, so dass in Rinderherz-Mitochondrien eine Stöchiometrie I:III:IV von 1:3:6 resultiert [349]. Die direkte Verbindung von Komplex IV zu den beiden anderen Atmungskettenkomplexen zeigt sich auch dadurch, dass z.B. aus Bakterien [361, 362] und Archaeen [363] stabile Superkomplexe aus Komplex III und IV isoliert werden konnten. Für die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase hingegen sind Hinweise auf spezifische Wechselwirkungen mit anderen Atmungskettenkomplexen seltener. Als Beispiel hierzu findet sich vorwiegend ein Kontakt zwischen den Komplexen II und III [358, 364]. Während die Isolierung und der Nachweis von Proteinkomplexen bis dahin sehr beschwerlich war, ermöglichte 1991 die Einführung der blau-nativen Elektrophorese eine Trennung und Analyse direkt nach der Solubilisierung von biologischen Membranen [365]. Außerdem erlauben *in-Gel*-Aktivitätstests eine direkte Bestimmung enzymatischer Aktivitäten [366]. Mit solchen Gelen ließ sich die oben aufgeführte Stöchiometrie der Atmungskettenkomplexe zueinander verifizieren [367]. Darüber hinaus stellt die blau-native Elektrophorese eine geeignete Methode zum Nachweis von Superkomplexen dar. Zu den ersten auf diese Weise ermittelten Assoziaten gehören neben dem ATP-Synthase-Dimer [288] unterschiedliche supramolekulare Komplexe $I_x III_y IV_z$ [368, 369]. Aus diesen Ergebnissen entwickelte sich das „Respirasom“-Modell mit zwei Kopien von $I_1 III_2 IV_4$ und einer Kopie $III_2 IV_4$ als Hauptbausteine des Netzwerks der Atmungskette [368]. Inzwischen ist dieses Modell überarbeitet worden und postuliert eine Zusammenlagerung der Bausteine zu Ketten, den sogenannten respiratorischen Strings [370, 371].

Eine wichtige Funktion der Superkomplexe ist die Stabilisierung von sonst instabilen Proteinkomplexen. So scheint in Säuger-Mitochondrien der Komplex III zur Erhaltung von Komplex I erforderlich zu sein, umgekehrt ist Komplex I aber wohl nicht für die Stabilität von III notwendig [372]. In Pilzen allerdings sind die Komplexe III und IV nicht essenziell für die Assemblierung bzw. Stabilität von Komplex I [373]. Eine große funktionelle Bedeutung der Superkomplexe zeigt sich dadurch, dass als Ursache von Mitochondrien-Defekten eher eine fehlerhafte Superkomplex-Organisation als Defekte bei individuellen Komplexen vermutet werden [374]. Ergänzend zu den elektrophoretischen Belegen, zeigen auch neue kinetische Messungen, dass sich in Säugern die Komplexe I und III bzw. in Pflanzen-Mitochondrien I, III und IV als eine Einheit verhalten [375]. Diese Superkomplexe stellen keine zufälligen Zusammenlagerungen dar, sondern es erfolgt ein koordinierter Zusammenbau [376]. Bei der Entstehung von Superkomplexen sind aber nicht nur Proteinkomponenten wichtig, auch die Lipide müssen berücksichtigt werden. Vor allem Cardiolipin ist von entscheidender Bedeutung als „Klebstoff“ für die Atmungskette [377–379]. Diese verbindende Funktion des Lipids kann aus Kristallstrukturen der individuellen Komplexe gefolgert werden. Eine Analyse der Membranproteinkristalle zeigt, dass sie neben den Proteinkomponenten auch Lipide (häufig Cardiolipin) enthalten. Von solchen Informationen ausgehend wird vorgeschlagen, dass Cardiolipin die Ladung von Lysin-Resten an der Kontaktfläche zwischen den Komplexen III und IV neutralisiert und dadurch den Superkomplex stabilisiert [380]. Wenn statt Mitochondrien aus Tieren solche aus Pflanzen untersucht werden, zeigen sich beim Aufbau der individuellen Komplexe schon deutliche Unterschiede. So besitzt Komplex I aus Kartoffeln eine deutlich größere Masse als das Homolog aus Rind [381]. Diese Massendifferenz erklärt sich aus der Tatsache, dass die pflanzlichen Atmungskettenkomplexe zusätzliche Untereinheiten enthalten [382]. Die Pflanzen-spezifischen Untereinheiten sind zwar in ihrer Funktion nur zu einem geringen Teil charakterisiert, aber teilweise sind es Enzyme aus anderen Stoffwechselwegen. Dadurch lassen sich metabolische Prozesse zusammenschalten und ermöglichen einen effizienten Fluss von Substraten [34].

4 Ergebnisse der eigenen Untersuchungen

4.1 Isolierung und Reinigung von Membranproteinkomplexen

Die sehr unterschiedlichen Eigenschaften und Anforderungen von Membranproteinkomplexen erfordern eine spezifische Anpassung von Isolierungs- und Reinigungsmethoden. Das hat zur Folge, dass eine etablierte Prozedur für einen bestimmten Membranproteinkomplex schon beim Wechsel auf einen anderen Organismus, auch wenn er verwandt ist, wieder neu ausgearbeitet werden muss. Während der Doktorarbeit [178] habe ich für die Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat chromatographische Reinigungsverfahren optimiert [383, 384]. Bei Verwendung des milden Detergens Dodecylmaltosid während der Präparation ließ sich durch Anionenaustausch-Chromatographie [383] bzw. Farbstoffliganden-Chromatographie [384] hochreine ATP-Synthase erhalten. Diese Proben waren die Voraussetzung für die Ermittlung der Anzahl der Untereinheiten III im membranintegralen Oligomer von Spinat [220]. Um auch die ATP-Synthasen anderer photosynthetischer Organismen charakterisieren zu können, erfolgten umfangreiche Arbeiten zur Etablierung geeigneter Reinigungsvorschriften. Weiterhin war die für Spinat ermittelte III₁₄-Stöchiometrie vor allem aufgrund der Verwendung von SDS bei der Probenherstellung nicht allgemein anerkannt, sondern musste durch ergänzende Messungen verifiziert werden.

4.1.1 Isolierung von Proteinkomplexen mittels präparativer Gelelektrophorese

Im Laufe einer mittlerweile mehr als siebzigjährigen Geschichte hat sich die Elektrophorese zu einer weitverbreiteten Trenntechnik mit vielen Anwendungsgebieten entwickelt [385]. Bei der Analyse von denaturierten Proteinen kommt der diskontinuierlichen Gelelektrophorese mit einem Sammel- und einem Trenngel aus Acrylamid [386, 387] eine sehr große Bedeutung zu. Andererseits bietet sich auch die Möglichkeit durch Vermeidung denaturierender Zusätze eine Elektrophorese unter nativen Bedingungen und in präparativem Maßstab durchzuführen (Übersicht in [132]).

Sehr häufige Verwendung findet heutzutage die sogenannte „blau-native Elektrophorese“ (BN-PAGE), bei der der Farbstoff Coomassie Blau G-250 (CBBG) an Proteine bindet und durch seine negative Eigenladung die Wanderung im elektrischen Feld ermöglicht/verbessert [365] (siehe Abb. 4.1). Zur Untersuchung von Membranproteinkomplexen müssen diese zunächst mit einem milden Detergens solubilisiert werden. Anschließend können sie mit Coomassie Blau G-250 versetzt und auf ein BN-Gel aufgetragen werden (Abb. 4.1). Durch die Kombination des Farbstoffs mit milden Detergenzien ist eine Wanderung von Membranproteinen entsprechend ihrer Masse sichergestellt. Bei dieser Methode kommt es zu keinem plötzlichen Wechsel des pH-Wertes, der bei der normalen diskontinuierlichen Elektrophorese beim Übertritt der Proteine vom Sammelgel (pH 6,8) ins Trenngel (pH 8,8) stattfindet. Stattdessen ist der pH-Wert auf 7,5 festgelegt, so dass sich bei der BN-PAGE zwischen Sammel- und Trenngel nur die Vernetzung des Acrylamidgels ändert. Als ergänzende Verfahren entwickelten sich aus der BN-PAGE die farblos-native Elektrophorese (CN-PAGE) [388] sowie die hochauflösende farblos-native Elektrophorese (HR-CN-PAGE) [389].

Bei mitochondrialen Proteinen ist die Anwesenheit von Coomassie Blau G-250 notwendig, um eine sinnvolle Auftrennung von Proteinkomplexen während der nativen Elektrophorese zu erhalten. Dagegen lässt sich bei der Elektrophorese von Chloroplasten-Proteinen der Farbstoff weglassen. So konnte bei Verwendung eines nativen Gels mit DDM für Spinat gezeigt werden, dass die Proteine fast quantitativ zur Anode wandern [390]. Die Charakterisierung der aufgetrennten Proteinkomplexe erfolgt häufig durch eine weitere Elektrophorese unter nativen bzw. meist unter denaturierenden Bedingungen. Der Vorteil,

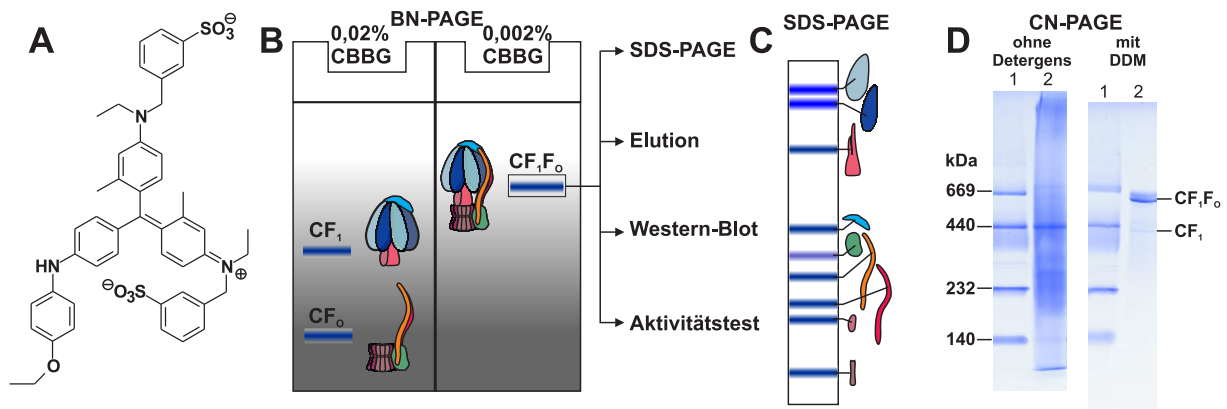


Abbildung 4.1: Elektrophorese von Protein(komplex)en. Durch Bindung des Farbstoffs Coomassie Blau G-250, CBBG (A) an Proteine erhalten diese eine netto negative Ladung. Wenn eine intakte Chloroplasten-ATP-Synthase auf ein BN-Gel mit hohen CBBG-Konzentrationen im Kathodenpuffer aufgetragen wird, zerfällt sie während der Elektrophorese in CF_1 und CF_0 (B). Bei Verringerung der Coomassiemenge auf 0,002% bleibt der Gesamtkomplex erhalten. Die Proteinbande bzw. ganze Spuren des Gels können für unterschiedliche Verfahren weiter verwendet werden (B). Schematisch ist die Auftrennung der ATP-Synthase-Bande aus einem BN-Gel in einer nachgeschalteten SDS-PAGE in ihre einzelnen Untereinheiten gezeigt (C). Bei der CN-PAGE von ATP-Synthase ohne Detergens im Gel zerfällt sie ebenfalls in CF_1 und CF_0 , durch DDM im Gel lässt sich dies verhindern (D: CN-Gele nachgefärbt mit Coomassie Blau R-250, Spur 1: Massenstandard, Spur 2: ATP-Synthase).

dass bei der nativen Elektrophorese innerhalb des Gels aktive Protein(komplex)e vorhanden sind, kann für enzymatische *in-Gel* Tests genutzt werden [366]. Aber nicht alle Testmethoden sind auf diese Weise realisierbar. Für die Messung der Aktivität von Membranproteinen, die Transportprozesse bewerkstelligen, sollten diese in Lipidmembranen eingebaut werden, was das Herauslösen aus der Gel-Matrix voraussetzt. Auch für spektroskopische Untersuchungen ist es besser, wenn eine homogene Lösung anstelle einer Gelbande vorliegt.

Isolierung von Proteinkomplexen aus BN-Gelen

Um Proteine wieder aus dem Gel zu extrahieren, gibt es eine Reihe von Verfahren, die entweder auf einer erneuten Elektrophorese (aus dem Gel in eine Lösung) oder aber auf der Diffusion basieren [132]. Für blau-native Gele wurde zunächst die Methode der Elektroelution eingesetzt [391] (siehe Abb. 4.2). Hierbei kommt das blau-gefärbte Gelmaterial in die etwas größere Kathodenkammer des Eluators. Durch Anlegen der Spannung wandern die negativ-geladenen Protein(komplex)e in die kleinere Anodenkammer und werden dort auf einer Membran konzentriert. Wenn der Überstand über der Membran vorsichtig entnommen wird, kann im optimalen Fall das Eluat in ca. 0,5 mL Puffer erhalten werden. So wurde eine Bande mit der Chloroplasten-ATP-Synthase aus einem blau-nativen Gel ausgeschnitten und eluiert. Nach Einbau von eluiertem CF_1F_0 in Liposomen zeigt sich eine deutlich geringere ATP-Synthase-Aktivität als bei herkömmlichen Präparationen [391]. Dies kann am Coomassie-Farbstoff oder der Wechselwirkung der Proteine mit der Membran des Eluators liegen. Bei einer zu langen Elutionsdauer kommt es zur Präzipitation der Proteine auf der Membran. Da die Präzipitate schlecht löslich sind und es bei der Ausfällung auch zu einer irreversiblen Denaturierung kommen kann, wurde versucht, zum Elutionspuffer Detergens zuzugeben. Allerdings zeigt sich dabei, dass das eluierte Material nicht mehr konzentriert wird, sondern sich im gesamten Eluator verteilt. Daher sollte Detergens erst nach Abschluss der Elution zugegeben werden, wenn der Überstand über der Membran der Anodenkammer entfernt ist und das Eluat entnommen wird.

Das durch präparative BN-PAGE erhaltene Eluat besitzt eine intensive blaue Farbe, wodurch Probleme bei anschließenden spektroskopischen oder kolorimetrischen Analyseverfahren auftreten können. In die-

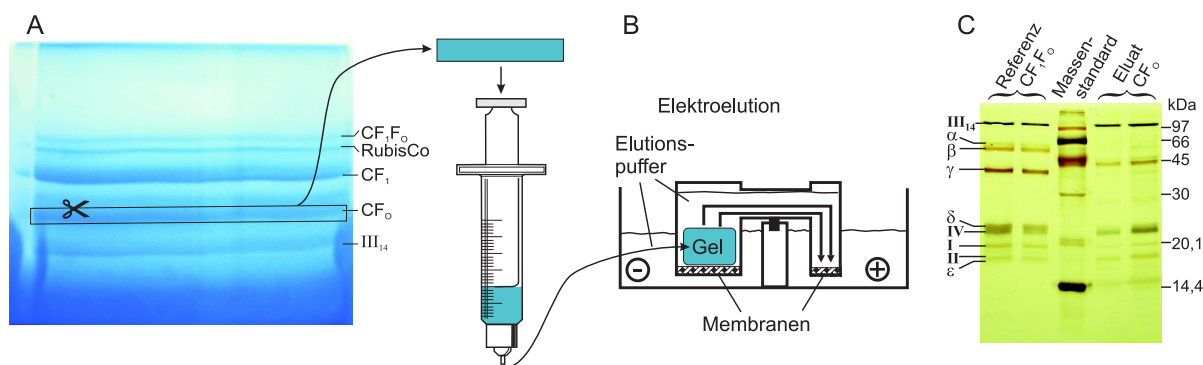


Abbildung 4.2: Isolierung von CF_0 aus Spinat mittels blau-nativer Elektrophorese. Eine Probe mit Chloroplasten-ATP-Synthase, vorgereinigt durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation in Anwesenheit von Triton X-100, wird für 30 min bei Zimmertemperatur mit 0,02 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Endkonzentration) inkubiert. Anschließend wird diese Probe auf ein blau-natives Gradientengel (5–13 % (w/v) Acrylamid) aufgetragen (A). Die CF_0 -Bande wird nach der Elektrophorese ausgeschnitten, durch eine Spritze gepresst und elektroeluiert (B, modifiziert nach [132]). Durch eine anschließende SDS-Gelelektrophorese wird das Eluat analysiert (C).

sem Fall empfiehlt es sich den Farbstoff wieder zu entfernen. Dies lässt sich durch eine Größenausschluss-Chromatographie in Gegenwart des Detergens CHAPS bewerkstelligen [391]. Zwar ist die ATP-Synthase in CHAPS weniger stabil [178], aber bei der Verwendung sehr milder Detergenzien gelingt die Abtrennung des Farbstoffs nicht [392]. Eine Aktivitätsmessung der ATP-Synthase nach Abtrennung von CBBG zeigte ähnliche Werte wie bei einer Isolierung der ATP-Synthase in Gegenwart von CHAPS [391]. Die aufwändige Entfernung des Farbstoffs kann bei Einsatz der CN- anstelle einer BN-PAGE vermieden werden, was gerade für Chloroplasten-Proteine naheliegend ist. Durch das Weglassen des Farbstoffs entfällt auch das Problem der Schädigung von Proteinkomplexen, welches hohe Coomassie-Konzentrationen mit sich bringen. So haben die bei der Elektrophorese eingesetzten Puffer einen entscheidenden Einfluss auf die Erhaltung der vollständigen ATP-Synthase. Wenn wie in der Original-Vorschrift [365] ein Kathodenpuffer mit 0,02% Coomassie verwendet wird, ist der Zerfall der Chloroplasten-ATP-Synthase in CF_1 und CF_0 zu beobachten [393]. Dieser Vorgang kann auch gezielt zur Isolierung des CF_0 -Komplexes eingesetzt werden (siehe Abb. 4.2). Durch Ansetzen eines Kathodenpuffers mit nur 0,002% Coomassie bleibt CF_1F_0 intakt.

Isolierung von Proteinkomplexen aus CN-Gelen

Im Prinzip lässt sich eine farblos-native Elektrophorese dadurch realisieren, dass CBBG im Kathodenpuffer nicht nur reduziert sondern ganz weggelassen wird. Die auf das Gel aufgetragenen Proteine wandern dann aufgrund ihrer Eigenladung im elektrischen Feld. Für Membranproteine muss bei dieser Wanderung aber ausreichend Detergens anwesend sein. Um zunächst in das Gel einzulaufen, reichen teilweise die Restmengen an Detergens des Solubilisats/der Proteinpräparation, aber nicht für den Lauf durch das Trenngel. So lässt sich für die Chloroplasten-ATP-Synthase ein Zerfall in CF_1 und CF_0 bei der Verwendung von Gelen ohne Detergens beobachten (siehe Abb. 4.1). Wenn aber mindestens 0,02% DDM oder Digitonin beim Vorbereiten der Sammel- und Trenngellösungen zugegeben wird, bleibt der Gesamtkomplex erhalten. Im Gegensatz dazu wird bei der HR-CN-PAGE dem Kathodenpuffer Detergens zugesetzt [389]. Aufgrund des höheren Volumens an Puffer im Vergleich zum Gel selbst wird auch deutlich mehr Detergens für die HR-CN-PAGE benötigt, was bei teuren Detergenzien problematisch ist.

Bei der Elektroelution von Banden aus der CN-PAGE, egal ob mit oder ohne Detergens, tritt wieder das Problem auf, dass sich Proteine im ganzen Eluator verteilen und nicht mehr konzentriert werden. Daher sollte für die Elution von Proteinen aus CN-Gelen die Diffusionselution (passive Elution) eingesetzt werden (siehe Abb. 4.4 auf S. 30). Hierbei wird das Gelmaterial zerkleinert und dann in Puffer inkubiert. Wie

schon für die CN-PAGE selbst beschrieben, ist auch bei der Diffusionselution die Zugabe von Detergens zu dem verwendeten Elutionspuffer notwendig. Zur Elution einer intakten Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat war die Zugabe von mindestens 0,05% DDM oder Digitonin zum Puffer erforderlich (Daten nicht gezeigt).

4.1.2 Isolierung der ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Wichtige offene Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden sollten, bezogen sich auf das Protonentransportierende Oligomer III_x . Hierbei war zu klären, ob die Stöchiometrie von Monomeren der Untereinheit III im Oligomer fixiert ist oder metabolisch reguliert werden kann (siehe Abschnitt 4.2.2, ab S. 42). Zwar eignet sich Spinat zur Isolierung recht hohen Mengen an ATP-Synthase, aber die Möglichkeiten zur Einflussnahme auf die Kultivierung, z.B. Variation der Umweltbedingungen, sind begrenzt. Alternativ hierzu wurde daher ein einzelliger Organismus als Modell für höhere Pflanzen gewählt. Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (als „photosynthetische Hefe“ [394]) ist ein Modellorganismus für Untersuchungen zur DNA-Reparatur [395], zirkadianen Uhr [396, 397], Phototaxis [398], Synthese von Pigmenten [399], zum RNA-Metabolismus [400] oder zum Bedarf an Spurenelementen [401] und vielen weiteren Fragestellungen [402]. Auch die Genome sind inzwischen sequenziert [403], und durch die leicht realisierbare Einflussnahme auf die *Chlamydomonas*-DNA [404] bietet sich die Grünalge auch als universelles Proteinexpressionssystem an [405].

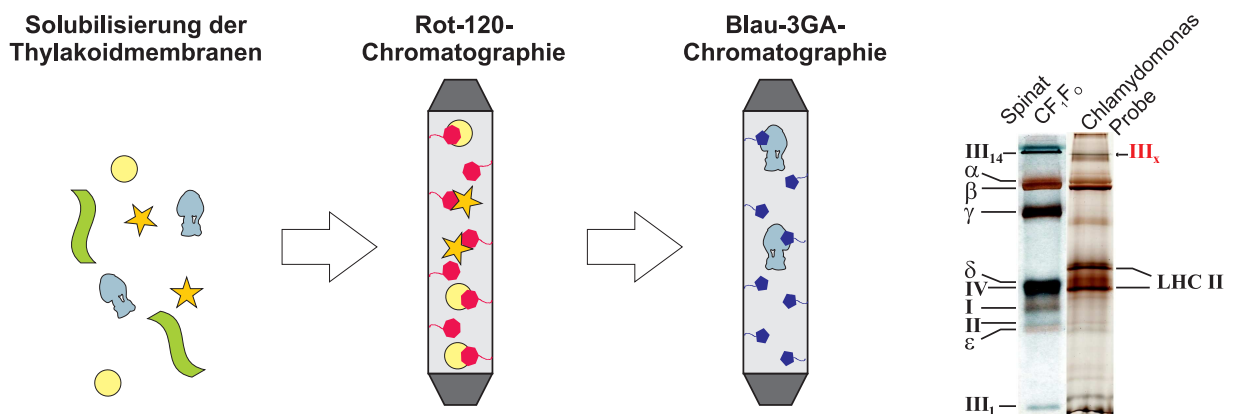


Abbildung 4.3: Reinigung der ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* mittels Chromatographie. Nach der Solubilisierung der Thylakoidmembran mit milden Detergenzien erfolgt die Reinigung der ATP-Synthase durch Farbstoffliganden-Chromatographie. Die erste Säule mit dem Farbstoff Rot-120 bindet viele Fremdproteine und lässt die ATP-Synthase ungehindert passieren. Im nächsten Schritt erfolgt die Bindung der ATP-Synthase an den Farbstoff Blau-3GA. Durch einen Detergenswechsel verändert sich die Wechselwirkung zwischen dem Proteinkomplex und Blau-3GA: bei Anwesenheit von Dodecylmaltosid bindet die ATP-Synthase, mit CHAPS erfolgt das Ablösen von der Säule. Die auf diese Weise erhaltene ATP-Synthase wird auf ein denaturierendes Gel zusammen mit einer Referenz-ATP-Synthase aus Spinat aufgetragen (Gel nach Silberfärbung entnommen aus [406]). Durch Vergleich der Wanderungstrecke im Gel lässt sich grob einschätzen, welche Untereinheiten die Probe aus *Chlamydomonas reinhardtii* enthält, z.B. ein Oligomer von Untereinheit III.

Reinigung der ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* mittels Chromatographie

Von verschiedenen Arbeitsgruppen sind bereits Verfahren für die Isolierung der Chloroplasten-ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben (z.B. [407, 408]). Allerdings ist aus den Manuskripten ersichtlich, dass bei der Präparation das Oligomer der Untereinheit III nicht intakt bleibt, sondern in die Monomere dissoziiert. In Zusammenarbeit mit J. Meyer zu Tittingdorf, S. Rexroth und E. Schäfer wurde daher versucht, diese ATP-Synthase mit einem intakten III -Oligomer zu isolieren [406,

409, 410]. Als erster Schritt musste die Anzucht der Grünalge bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen etabliert werden. *Chlamydomonas reinhardtii* lässt sich in einem Minimalmedium [411] unter photoautotrophen Bedingungen kultivieren, d.h. mit der Photosynthese als alleiniger Quelle der Energiegewinnung. Alternativ hierzu kann Acetat als zusätzliches Substrat dem Medium zugesetzt werden [412], so dass photomixotrophe Bedingungen eingestellt sind (sowohl Photosynthese als auch oxidative Phosphorylierung). Bei beiden Wachstumsbedingungen war die Chloroplasten-ATP-Synthase in nativen und denaturierenden Gelen eindeutig identifizierbar [413]. Diese Arbeiten bildeten die Grundlage für die weitere Isolierung.

Aufbauend auf den zuvor für Spinat etablierten chromatographischen Reinigungsverfahren über Farbstoffliganden-Säulen [178, 414] konnte eine Methode etabliert werden, bei der das Oligomer der Untereinheit III intakt bleibt [406, 415]. Bei dieser Methode erfolgt nach der Solubilisierung der Thylakoidmembranen direkt eine Reinigung über den Farbstoffliganden Rot-120. Diese erste Chromatographie dient zur Vorreinigung, wobei in Anwesenheit von Dodecylmaltosid im Elutionspuffer nur die Fremdproteine an das Säulenmaterial binden, während die ATP-Synthase ungehindert das Säulenmaterial passiert. Im nächsten Schritt findet dann die weitere Reinigung durch den Farbstoffliganden Cibacron Blau 3GA statt. Hier wird das Detergens-abhängige Bindeverhalten der ATP-Synthase an Säulen ausgenutzt [384]. In Anwesenheit von Dodecylmaltosid bindet die ATP-Synthase stark an den Blau-3GA-Farbstoff, beim Wechsel auf CHAPS erfolgt hingegen die Elution. Das erhaltene Eluat zeigte zwar neben den Banden der ATP-Synthase-Untereinheiten auch Proteine der Lichtsammelkomplexe, aber sowohl durch klassische Edman-Sequenzierung als auch mit der Massenspektrometrie ließ sich das III-Oligomer eindeutig identifizieren ([415], siehe Abb. 4.3).

Der isolierte Komplex enthält neben dem Oligomer der Untereinheit III alle Komponenten des CF_1 -Komplexes. Er besitzt eine ähnliche Zusammensetzung wie der Kernkomplex $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon_{10}$ aus Hefe, der zur Bestimmung der Stöchiometrie der c-Untereinheit aus Mitochondrien verwendet wurde [242], bzw. der Komplex $CF_1 + III_x$ aus Spinat [416]. Eine Messung der ATP-Synthase-Aktivität ist mit diesem Komplex zwar nicht möglich, aber er eignet sich für die Untersuchung einer variablen Stöchiometrie des Oligomers III_x (siehe Abschnitt 4.2.2, S. 39).

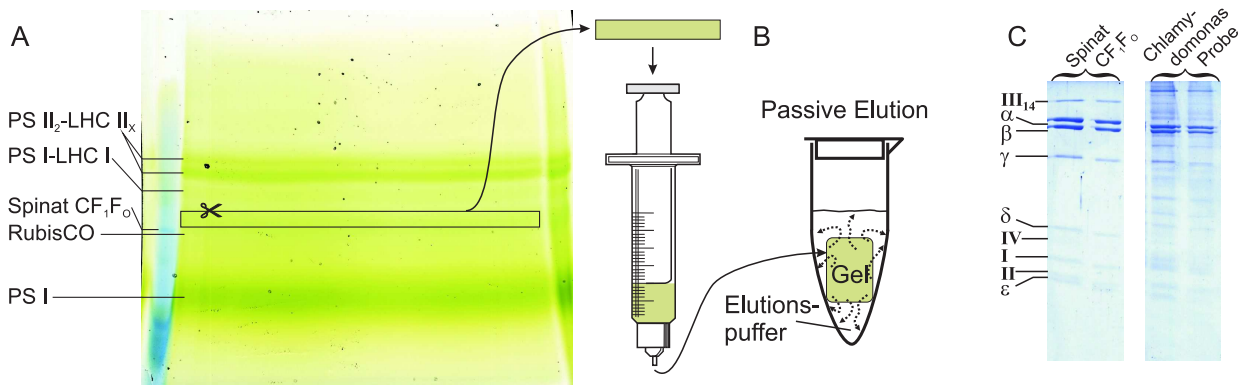


Abbildung 4.4: Reinigung der ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* mittels präparativer Gelelektrophorese. (A) CN-Gel nach der Elektrophorese, (B) Schema der passiven Elution, (C) Coomassie Blau R-250 gefärbtes SDS-Gel einer Referenz-ATP-Synthase aus Spinat und *Chlamydomonas*-ATP-Synthase aus CN-PAGE/passiver Elution. Nach der Solubilisierung der Thylakoidmembran mit Digitonin wird das Solubilisat direkt auf ein natives Gel mit 0,05% Digitonin aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt mit Puffern für die CN-PAGE ohne Zugabe von Detergenzien [392]. An Hand einer Referenz-Spur mit hochreiner Spinat-ATP-Synthase wird eine Bande ausgeschnitten und zur Zerkleinerung durch eine Spritze gepresst (A). Durch Zugabe von Puffer mit Digitonin diffundieren die Proteine aus dem Gel in den Elutionspuffer (B). Das erhaltene *Chlamydomonas reinhardtii*-Eluat zeigt auf SDS-Gelen eine ähnliche Zusammensetzung wie die Spinat-ATP-Synthase (C).

Reinigung der ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* mittels präparativer Gelelektrophorese

Ein alternativer Weg zur Isolierung empfindlicher Proteinkomplexe ist die präparative native Gelelektrophorese. In nativen Gelen kann die Chloroplasten-ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* als intakter Komplex identifiziert werden (siehe z.B. [413]). Dabei haben die bei der Elektrophorese eingesetzten Puffer einen entscheidenden Einfluss auf die Erhaltung der vollständigen ATP-Synthase (siehe S. 27). Wichtig ist bei der blau-nativen Elektrophorese die Verwendung eines Kathodenpuffers mit geringer Coomassie-Konzentration, also 0,002%, für die gelelektrophoretische Isolierung von intaktem CF_1F_0 [393]. Aufgrund der guten Auftrennung in BN-Gelen wurde zunächst versucht dieses Verfahren für die Isolierung der ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* einzusetzen. Hierbei ist zwar nach der Elektrophorese eine deutliche Bande für CF_1F_0 vorhanden, aber beim Versuch, diese Bande zu eluieren, zerfällt die ATP-Synthase in ihre Subkomplexe CF_1 und CF_0 (Daten nicht gezeigt). Der Zerfall kann sowohl bei passiver Elution als auch bei der Elektroelution beobachtet werden.

Als milde Alternative zur blau-nativen Elektrophorese eignet sich die farblos-native Variante [388, 417]. Aufgrund der Erfahrungen bei der präparativen CN-PAGE mit Spinat-ATP-Synthase (siehe S.27) enthielten die Gele für die *Chlamydomonas reinhardtii*-Proben 0,05% Detergens. Dadurch erhält man eine leicht grün gefärbte CF_1F_0 -Bande mit leicht höherer apparenter Masse als die ATP-Synthase aus Spinat (siehe Abb. 4.4 (A)). Da die Elektroelution für CN-Gele nicht geeignet ist (siehe S. 28), wurden die Banden stattdessen für die passive Elution in Detergens-haltigem Puffer inkubiert. Elutionsversuche, bei denen entweder DDM oder Digitonin für den kompletten Ablauf (siehe Abb. 4.4) eingesetzt wurden, zeigten, dass mit Digitonin mehr ATP-Synthase-Gesamtkomplex erhalten werden kann. Dass wirklich alle Untereinheiten im *Chlamydomonas reinhardtii*-Eluat vorhanden sind, zeigte die SDS-PAGE beim Vergleich mit der Referenz aus Spinat (siehe Abb. 4.4 (C)). Während also bei dem chromatographischen Verfahren nur eine unvollständige ATP-Synthase resultiert, ist *Chlamydomonas reinhardtii*- CF_1F_0 aus der CN-PAGE intakt, was sich auch durch eine erneute native Elektrophorese mit dem Eluat nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt). Als weiterer Nachweis für die Intaktheit der ATP-Synthase wurde ein Aktivitätstest durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das während der CN-PAGE verwendete Digitonin bei der Rekonstitution des Eluats in die Membran von Liposomen nur schlecht entfernt wird. Die erhaltenen Liposomen mit *Chlamydomonas reinhardtii*- CF_1F_0 zeigten immerhin eine schwache ATP-Synthase-Aktivität, die auch durch DCCD hemmbar war (Daten nicht gezeigt). Das Verfahren wurde später in Zusammenarbeit mit N. G. Heidrich [418] optimiert.

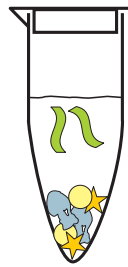
4.1.3 Isolierung der ATP-Synthase aus *Thermosynechococcus elongatus*

Die Instabilität von isolierten Membranproteinkomplexen in Detergensiösung macht eine erfolgreiche funktionelle und strukturelle Charakterisierung oft schwierig und kann sie mitunter sogar verhindern. Bei Proteinen aus thermophilen Organismen wird hingegen eine deutlich höhere Stabilität als bei den mesophilen Homologen beobachtet, wodurch „Thermostzyme“ für viele Anwendungen interessant sind [419–423]. Für das thermophile Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* ist das Genom vollständig sequenziert [424], was die Identifizierung von Proteinbanden mit Proteaseverdau und Massenspektrometrie vereinfacht. Außerdem konnten für diesen Organismus schon beide Photosysteme kristallisiert und ihre Struktur mit hoher Auflösung ermittelt werden [425, 426]. Für die ATP-Synthase ist die Struktur der ϵ -Untereinheit aus *T. elongatus* mittels NMR-Spektroskopie untersucht worden [427]. Daher besteht neben der erwarteten höheren Stabilität auch die Hoffnung, dass eine Strukturaufklärung von Proteinen aus dem thermophilen Cyanobakterium leichter realisierbar ist als bei solchen aus komplexeren Organismen. Die Anzucht von *Thermosynechococcus elongatus* fand bei 55°C an der Ruhr-Universität Bochum bei A. Poetsch statt. Dort wurden auch die Thylakoidmembranen durch Zellaufschluss nach der Stickstoff-Dekompressionsmethode präpariert [428]. Mit diesen Thylakoidmembranproben begann dann die Optimierung der Reinigungsprozedur für die ATP-Synthase in Darmstadt (siehe Abb. 4.5).

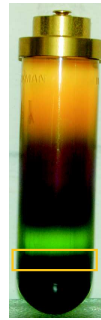
Solubilisierung der
Thylakoidmembranen



Ammoniumsulfat-
Fällung



Dichtegradienten-
zentrifugation



Rot-120-
Chromatographie



Anionenaustausch-
Chromatographie



Abbildung 4.5: Reinigung der ATP-Synthase aus *Thermosynechococcus elongatus*. Nach der Solubilisierung der Thylakoidmembran mit milden Detergenzien erfolgt eine Zugabe von Ammoniumsulfat zur Abtrennung von Fremdproteinen. Durch Einstellen einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 50% der Sättigungskonzentration präzipitiert die ATP-Synthase. Nach Lösen in geringen Mengen an Puffer wird dieses Sediment auf einen linearen Dichtegradienten mit 15–50% (w/v) Saccharose aufgetragen. Im Bereich von 35–40% Saccharose kann nach der Zentrifugation die ATP-Synthase identifiziert werden. Bei der anschließenden Farbstoffliganden-Chromatographie binden viele Fremdproteine an den Farbstoff Rot-120. Der letzte Reinigungsschritt ist eine Anionenaustausch-Chromatographie, bei der eine sehr reine ATP-Synthase-Fraktion durch Elution mit linear steigenden Kochsalzkonzentrationen erhalten wird.

Da die Solubilisierung der Thylakoidmembranen einen entscheidenden Einfluss bei der Isolierung der Membranproteinkomplexe hat, erfolgten zunächst Tests mit unterschiedlichen Detergenzien. Mit Hilfe denaturierender und nativer Gele sollte festgestellt werden, welches Detergens geeignet ist, um große Mengen intakter ATP-Synthase zu isolieren. Für den F_1F_0 -Nachweis wurden Western-Blots der Gele mit unterschiedlichen Antikörpern gegen die ATP-Synthase aus Spinat untersucht. Nach der Elektrophorese erfolgte hierzu der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran. Die Membran kam dann in eine Lösung mit dem Antikörper gegen eine Untereinheit der ATP-Synthase und nach einigen Waschschritten in eine weitere Lösung mit dem Zweitantikörper-Konjugat. Dieser Zweitantikörper bindet an den ATP-Synthase-Antikörper. Gleichzeitig ist in dem Konjugat eine enzymatische Funktion enthalten, Meerrettich-Peroxidase oder Alkalische Phosphatase, durch welche dann der Nachweis erfolgt [429]. Die Peroxidase kann in einer Luminol-haltigen Lösung inkubiert werden, wodurch sich die markierten Banden mittels Chemilumineszenz detektieren und quantifizieren lassen. Bei der Alkalischen Phosphatase findet der Nachweis über eine Farbreaktion statt. Hierbei erfolgt eine Dephosphorylierung von BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat), was zur Bildung eines blauen Indigofarbstoffs führt. Farbverstärkend wirkt die Reaktion mit dem Oxidationsmittel NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid), welches ebenfalls einen blauen Farbstoff bildet. Die dadurch entstandenen farbigen Banden auf der Membran lassen sich zwar schlecht quantifizieren, aber im Rahmen dieser Arbeit war dieser Test sensitiver als die Chemilumineszenz-Reaktion der Peroxidase. Diese Voruntersuchungen zeigten, dass sowohl Untereinheiten des F_1 -Komplexes von *Thermosynechococcus elongatus*, als auch solche von F_0 nachgewiesen werden können. Außerdem ließ sich dadurch auch zuordnen, welche Bande in nativen Gelen die intakte ATP-Synthase ist (siehe Abb. 4.6).

Im Rahmen der Solubilisierungstests ergab sich, dass Decyl- und Dodecylmaltosid, Decanoyl- und Dodecanoylsaccharose sowie Digitonin sehr geeignete Varianten zur Isolierung des F_1F_0 -Gesamtkomplexes sind. Um eine möglichst quantitative Solubilisierung zu erreichen, war eine Mischung von Dodecylmaltosid und Natriumcholat sowie zusätzlicher Ultraschall-Behandlung am besten geeignet [428]. Da das Solubilisat vorwiegend andere Proteine (vor allem Phycobilisomen) und kaum ATP-Synthase enthielt, waren noch weitere Reinigungsschritte erforderlich. In Anlehnung an die Präparation der ATP-Synthase aus Spinat [178] schloss sich an die Solubilisierung eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung an. Für

Spinat- CF_1F_0 konnten durch einen ersten Fällungsschritt mit 30% der Sättigungskonzentration Fremdproteine abgetrennt und mit einem zweiten Schritt bei 45% Ammoniumsulfatsättigung die ATP-Synthase ausgefällt werden. Bei *T. elongatus* waren bei der Fällung mit 30% Ammoniumsulfat zwar einige ATP-Synthase-Untereinheiten im Sediment zu finden, aber keine vollständige ATP-Synthase (Daten nicht gezeigt). Für den zweiten Fällungsschritt erwies es sich als sinnvoll, die Ammoniumsulfatmenge auf 50% der Sättigungskonzentration zu erhöhen, um möglichst viel ATP-Synthase zu isolieren.

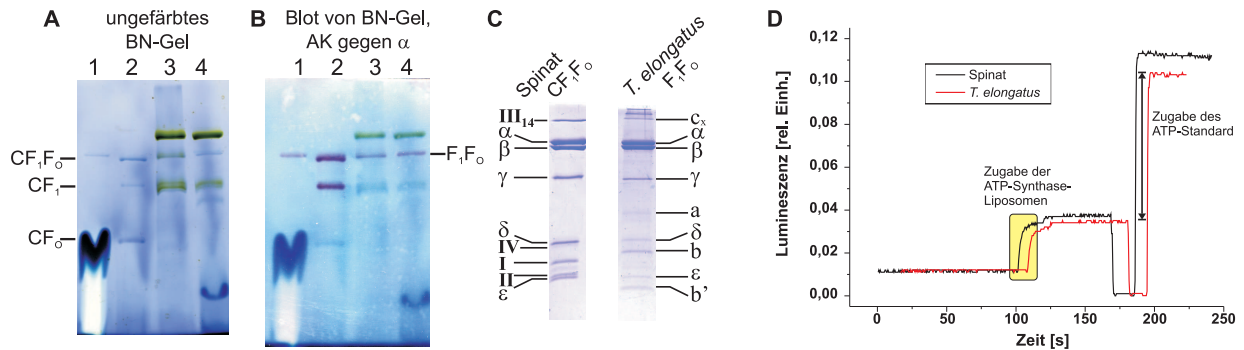


Abbildung 4.6: Gelelektrophoretische Analyse und enzymatische Aktivität der ATP-Synthase aus *Thermosynechococcus elongatus*. Proben der Reinigungsschritte zur Isolierung von *Thermosynechococcus elongatus* F_1F_0 (siehe Abb. 4.5) werden auf blau-native (A und B) bzw. denaturierende (C) Gele aufgetragen. A: Gel direkt nach der blau-nativen Elektrophorese; B: Western-Blot des Gels gegen die α -Untereinheit der (Spinat-)ATP-Synthase, angefärbt über die Reaktion der Alkalischen Phosphatase mit den Substraten BCIP/NBT; C: Coomassie R-250 gefärbtes SDS-Gel; D: Aktivitätstest mit ATP-Synthasen aus Spinat und *T. elongatus*. Auf die Gele wurden aufgetragen: *T. elongatus* F_1F_0 nach der Rot-120-Chromatographie (Spur 1), Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat als Referenz (Spur 2), das Sediment der Fällung von *T. elongatus*-Solubilisat mit 50% Ammoniumsulfat (Spur 3), typische Fraktion aus dem Dichtegradienten mit ca. 38% (w/v) Saccharose (Spur 4); auf dem SDS-Gel ist F_1F_0 nach der Anionenaustausch-Chromatographie.

Auch nach dieser Vorreinigung waren die Banden der ATP-Synthase(-Untereinheiten) bei der Elektrophorese sehr schwach gegenüber großen Mengen anderer Protein(komplex)e. Die Dichtegradientenzentrifugation als nächster Schritt sorgte für eine bessere Auftrennung und entfernt viele Fremdproteine. Wie aber aus der starken Färbung der ATP-Synthase-Fraktionen zu erahnen war, waren diese immer noch mit Pigment-haltigen Fremdproteinen verunreinigt (siehe Abb. 4.5). Bei Spinat konnte die Farbstoffliganden-Chromatographie gerade Chlorophyll-haltige Proteine sehr gut von der ATP-Synthase abtrennen [384]. Daher wurden mehrere Farbstoffsäulen getestet, unter denen sich Rot-120 als beste erwies. Während der Rot-120-Chromatographie banden nur die Fremdproteine an die Säule, die ATP-Synthase eluierte direkt nach dem Auftragen. Durch die Gelelektrophorese ließ sich der Erfolg der Reinigung nachweisen. So zeigt das BN-Gel (Abb. 4.6), dass die Dichtegradientenfraktion (Spur 4 in A und B)) neben der ATP-Synthase weitere Proteinkomplexe enthielt. Die in Spur 1 der Abb. 4.6 (A und B) gezeigte Probe nach der Rot-120-Chromatographie bestand dagegen vorwiegend aus F_1F_0 , was durch den Western-Blot nachgewiesen wurde. In dieser Spur sind die Banden anderer Proteinkomplexe deutlich schwächer, allerdings wies die Probe immer noch eine leichte Grünfärbung auf. Um eine sehr saubere ATP-Synthase-Probe zu erhalten, kam das Rot-120-Eluat anschließend auf eine Anionenaustauschsäule. Durch linear ansteigende Mengen an Kochsalz im Chromatographiepuffer erfolgte die Elution einer jetzt farblosen ATP-Synthase-Fraktion bei etwa 0,4 M NaCl. Mit Hilfe eines SDS-Gels konnte nicht nur die Reinheit der Probe aus der Ionenaustausch-Chromatographie nachgewiesen werden, die Banden des Gels ließen sich auch für die Massenspektrometrie nutzen. Hierbei wurden zunächst die Banden der Untereinheiten von F_1 (α , β , γ , δ und ϵ) sowie die b-Untereinheit von F_0 identifiziert. Später konnten auch die anderen Untereinheiten eindeutig zugeordnet werden [428].

Neben der Reinheit war auch die enzymatische Aktivität der erhaltenen ATP-Synthase wichtig. Daher erfolgten mit den Proben der Chromatographie Aktivitätstests auf die ATP-Synthase-Aktivität. Während für die häufig eingesetzten ATP-Hydrolyse-Tests nur der F_1 -Teil der ATP-Synthase intakt sein muss, ist für die Herstellung von ATP der F_1F_0 -Gesamtkomplex erforderlich. Zum Nachweis der ATP-Synthase wird ein elektrochemischer Protonengradient als Triebkraft für F_1F_0 benötigt. Beim Einbau der ATP-Synthase in Liposomen kann zunächst ein bestimmter pH-Wert und eine definierte Salzkonzentration für das Lumen der Liposomen festgelegt werden. Durch Verdünnung der Liposomen mit einem anderen Puffer ändern sich dann die Bedingungen außerhalb der Liposomenmembran und der Gradient ist somit aufgebaut. Wenn aktiver F_1F_0 -Gesamtkomplex in die Liposomen eingebaut wurde, kann der Gradient zur ATP-Synthase genutzt werden [430].

Die Detektion erfolgt beim ATP-Synthase-Aktivitätstest über Biolumineszenz mit dem Luciferin/Luciferase-System [431]. Bei der Reaktion oxidiert die Luciferase ihr Substrat zusammen mit ATP und Sauerstoff zu Oxyluciferin, und gelb-grünes Licht wird ausgestrahlt. Für den Nachweis wird die Luciferin/Luciferase-Mischung vorgelegt und später die ATP-Synthase-Liposomen zugegeben. Durch die unterschiedlichen Protonen-/Salzkonzentrationen der beiden Lösungen kann die Synthese von ATP erfolgen. ATP wiederum wird direkt mit Luciferin umgesetzt, was von einem Anstieg der Lumineszenz begleitet wird. Die gemessenen relativen Werte für die Lumineszenz werden dann durch Zugabe definierter ATP-Mengen kalibriert. Mit der chromatographisch gereinigten ATP-Synthase aus *T. elongatus* zeigt der Aktivitätstest eine ATP-Synthase-Aktivität im Rahmen ähnlicher Werte, wie sie für Spinat- CF_1F_0 ermittelt wurden (Abb. 4.6). Als wichtiger Parameter erwies sich die Temperatur. Während bei niedrigen Temperaturen (4 bzw. 20°C) *T. elongatus*- F_1F_0 weniger als 50% der maximalen ATP-Synthase-Aktivität (bei 55°C) erreicht, tritt selbst bei 95°C noch kein vollständiges Versagen der Enzym-Aktivität ein. Die nachfolgenden Versuche in Zusammenarbeit mit T. Suhai bestätigten diese Thermostabilität und zeigten darüber hinaus auch eine höhere Stabilität gegenüber denaturierenden Agenzien und dem Coomassie-Farbstoff [428]. Die somit erhaltene sehr reine und enzymatisch aktive ATP-Synthase-Probe wurde anschließend für die 2D-Kristallisation eingesetzt.

4.1.4 Isolierung von Subkomplexen der ATP-Synthase aus Spinat

Auch wenn für das Verständnis der Funktionsweise eines Proteinkomplexes eine vollständige Strukturaufklärung wünschenswert ist, muss man bei den sehr empfindlichen Membranproteinkomplexen oft zufrieden sein, eine Teilstruktur zu erhalten. Solche Strukturen von Subkomplexen, wie die des F_1 -Teils der mitochondrialen ATP-Synthase [214] oder des hydrophilen Teils von Komplex I der Oxidativen Phosphorylierung ([432], können detaillierte Einblicke in den Aufbau und die Funktionsweise des Holoenzym liefern. Da vor allem der membranintegrale Teilkomplex der ATP-Synthase strukturell nur unzureichend charakterisiert ist, wurden für dessen Isolierung geeignete Methoden etabliert.

Isolierung des Oligomers III_{14}

Zur Klärung der Stöchiometrie in der Protonenturbine der ATP-Synthase sollte zumindest das Oligomer der protonentransportierenden Untereinheit in intakter Form isoliert werden. In der ATP-Synthase von Spinatchloroplasten ist dies das Oligomer von Untereinheit III, welches schon seit längerem aus elektrophoretischen Untersuchungen bekannt ist [433, 434]. Eine wichtige Voraussetzung für alle folgenden Untersuchungen ist die Stabilität des Oligomers III_{14} , die sich in Anwesenheit von denaturierenden Substanzen zeigt. So kann III_{14} auch in denaturierenden SDS-Gelen beobachtet werden (siehe Abb. 4.7). Diese Stabilität lässt sich nutzen, um ATP-Synthase-Proben unter harschen Bedingungen zu inkubieren. Dabei geht der Zusammenhalt der meisten Proteinkomplexe verloren, so dass schließlich nur das Oligomer von Untereinheit III als Proteinkomplex erhalten bleibt. Für die Aufklärung der III_{14} -Stöchiometrie in Spinat wird eine ATP-Synthase-Probe aus der Dichtegradienten-Zentrifugation mit SDS behandelt und über einen weiteren Dichtegradienten das Oligomer isoliert [435]. Als Detergenzien für die Vorbereitung

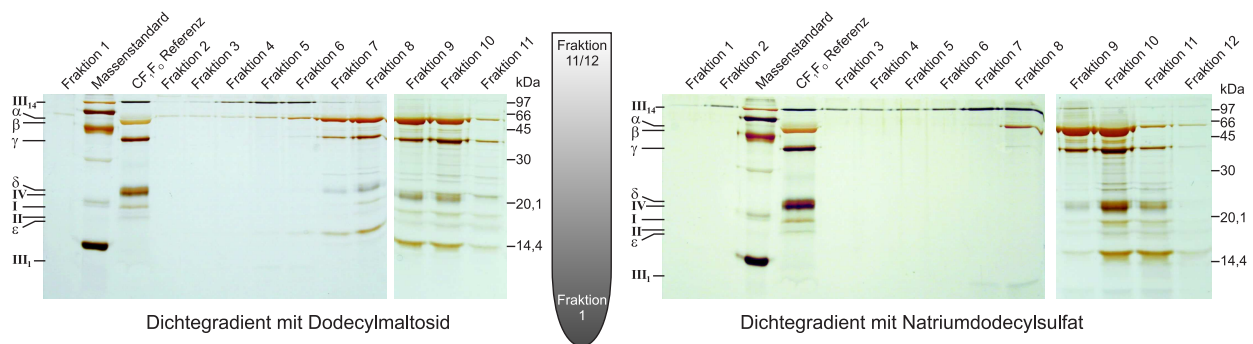


Abbildung 4.7: Isolierung des Oligomers III_{14} aus Spinat mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Eine Probe mit Chloroplasten-ATP-Synthase, vorgereinigt durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation in Anwesenheit von Triton X-100, wird dialysiert und für 30 min bei Raumtemperatur mit 1 % (w/v) SDS (Endkonzentration) inkubiert. Anschließend wird diese Probe auf einen Gradienten (7,5–30 % (w/v) Glycerol) aufgetragen und zentrifugiert. Die Fraktionen, die bei dieser Zentrifugation in Anwesenheit von SDS bzw. Dodecylmaltosid erhalten wurden, werden durch eine denaturierende Elektrophorese analysiert. Hierbei zeigt sich, dass bei Verwendung von SDS die Reinheit der Oligomer-Fraktionen höher ist: Vergleiche die Dodecylmaltosid-Fraktionen 4 bis 6 mit den SDS-Fraktionen 2 bis 7. Darüber hinaus wird sogar mehr III_{14} aus dem SDS-Gradienten erhalten. Gezeigt sind denaturierende Gele nach Silberfärbung.

des Gradienten eignen sich SDS und DDM (siehe Abb. 4.7). Wenn hingegen Octylthioglucosid eingesetzt wird, zerfällt das Oligomer größtenteils in III_1 (Daten nicht gezeigt). Ein von anderen Gruppen beschriebenes Verfahren zur Isolierung von III_{14} aus Spinat basiert auf der Inkubation von Membranen in Lauroylsarcosin [436–438]. Dieses Detergens wurde zuvor eingeführt, um die c_{11} -Oligomere aus *Ilyobacter tartaricus* [439] zu erhalten. Mittlerweile konnte auch die Kristallstruktur der auf diesem Weg isolierten *Ilyobacter*-Oligomere gelöst werden [440].

Isolierung des CF_0 -Komplexes durch Spaltung und Chromatographie

Zur Isolierung von CF_0 ist in der Literatur ein Verfahren beschrieben, bei dem die ATP-Synthase zunächst an einen schwachen Ionenaustauscher (Diethylaminoethylreste) bindet [441]. Durch Verwendung eines Puffers mit dem Detergens Zwittergent 3-12 erfolgt dann die Spaltung der ATP-Synthase und die Elution von CF_0 . Dieses Verfahren wurde daher auch zusammen mit D. Neff getestet, eine Isolierung von intaktem CF_0 gelang aber nicht [393]. Beim Vergleichen unterschiedlicher chromatographischer Reinigungsverfahren während der Dissertation hatte sich gezeigt, dass durch Chromatographie mit starken Ionenaustauschern (quartäre Ammoniumverbindungen) Teilkomplexe der ATP-Synthase von vollständigem CF_1F_0 getrennt werden können [178]. Bei der damals verwendeten Probe war der Zerfall durch die lange Lagerung von vollständiger ATP-Synthase eingetreten. Da dies schlecht reproduzierbar ist, sollte nun ein Verfahren zur gezielten Disassemblierung von CF_1F_0 ermittelt werden.

Die klassische Methode zur Spaltung der Chloroplasten-ATP-Synthase ist die Behandlung mit EDTA (S. 15), allerdings wird hierbei nur ein Teil der CF_1 -Teile abgetrennt (Daten nicht gezeigt). Als effizientere Verfahren ist die Behandlung von ATP-Synthase in Liposomen mit Natriumbromid [442] oder Guanidiniumchlorid [443] beschrieben. Die Natriumbromidmethode hat allerdings den Nachteil, dass die erhaltene CF_0 -Präparation instabil ist und in die Untereinheiten zerfällt [442]. Beim Verfahren mit Guanidiniumchlorid liegt die Spaltungseffizienz etwas niedriger als bei der zuvor erwähnten Methode, aber höher als mit EDTA. Allerdings ist die Stabilität von CF_0 aus der Guanidiniumchlorid-Spaltung besser als bei der Natriumbromid-Behandlung [443]. Um funktionelle Messungen des Protonenflusses durch CF_0 durchführen zu können, wurde der CF_1 -Teil mit einer Natriumthiocyanat-Behandlung entfernt [444]. Durch Verwendung von Guanidiniumthiocyanat ließen sich die CF_1 -Teile aus ATP-Synthase-Liposomen abtrennen, um mittels der Rasterkraftmikroskopie ringförmige Strukturen des CF_0 -Subkomplexes zu visualisieren [197].

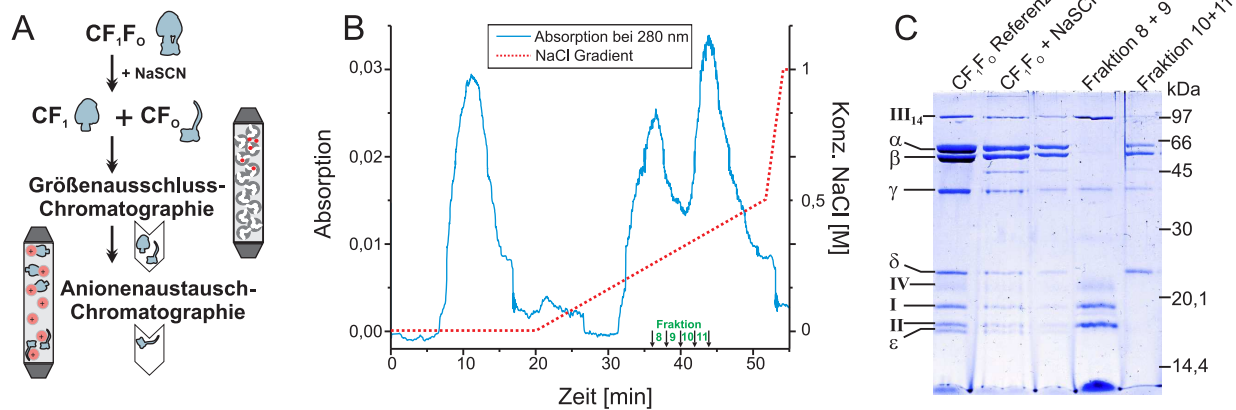


Abbildung 4.8: Isolierung von CF_0 durch Thiocyanat-Spaltung und Chromatographie. Eine Probe mit Chloroplasten-ATP-Synthase, gereinigt durch Farbstoffliganden-Chromatographie in Anwesenheit von Dodecylmaltosid, wird für 90 min bei 37°C mit 2 M Natriumthiocyanat (Endkonzentration) inkubiert. Anschließend wird dieser Ansatz über eine Gelfiltrationssäule entsalzt. Zur Trennung von CF_0 von den abgespaltenen Untereinheiten der ATP-Synthase wird die entsalzte Probe durch Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt (A). Durch kontinuierliche Erhöhung der Salzkonzentration eluieren die an den Ionenaustauscher gebundenen Proteine und werden fraktionsweise gesammelt. Hierbei sind im Elutionsprofil zwei größere Maxima erkennbar (B). Die zu diesen Maxima gehörigen Fraktionen sowie die ATP-Synthase vor und nach der Thiocyanat-Behandlung werden über SDS-Gelelektrophorese analysiert (Coomassie-Blau gefärbtes Gel in C).

In Zusammenarbeit mit S. Rexroth konnte ein chromatographisches Verfahren zur Isolierung von CF_0 aus gereinigter Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat ausgearbeitet werden. Hierbei erfolgte eine Spaltung mit Natriumbromid an solubilisiertem CF_1F_0 und danach die chromatographische Reinigung. Die Instabilität der so erhaltenen CF_0 -Präparation zeigte sich auch hier, denn die wesentlichen Banden im SDS-Gel waren die Untereinheit III, IV und γ , so dass der periphere Stiel wohl ebenfalls gespalten wurde [409, 445]. Daher wurde nachfolgend die Spaltungsprozedur mit unterschiedlichen Inkubationszeiten und Reagenzien getestet. Durch die Guanidiniumthiocyanat-Spaltung konnte die ATP-Synthase am effizientesten in CF_1 und CF_0 getrennt werden. Als beste Variante stellte sich aber die Behandlung mit Natriumthiocyanat heraus, bei der alle Untereinheiten von CF_0 im Eluat der Anionenaustausch-Chromatographie zu finden sind (siehe Abb. 4.8). Beide Probe dienten als Ausgangsmaterial für 2D-Kristallisationsansätze [446].

Isolierung des CF_0 -Komplexes durch blau-native Gelelektrophorese

Neben der Dichtegradientenzentrifugation und Chromatographie kann auch die Gelelektrophorese präparativ zur Proteinisolierung eingesetzt werden [132]. Wie zuvor schon schematisch gezeigt (siehe Abb. 4.1, S. 27) kann die vollständige ATP-Synthase während der blau-nativen Elektrophorese gespalten werden. Wichtig hierfür ist die Anwesenheit ausreichender Mengen an Coomassie-Brillant-Blau G-250. Auf diesem Wege ist somit die Isolierung des CF_0 -Subkomplexes realisierbar. Dazu wird eine Probe mit vorgereinigter ATP-Synthase zunächst mit 0,02% (w/v) CBBG inkubiert und anschließend durch BN-PAGE aufgetrennt (siehe Abb. 4.2 auf S. 28). Zur erfolgreichen Isolierung von CF_0 sollte eine ATP-Synthase-Probe aus einem Dichtegradienten mit Triton X-100 verwendet werden. Eine solche Probe beinhaltet zwar neben CF_1F_0 noch weitere Proteine (z.B. Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase, RubisCo), ist aber besser geeignet als chromatographisch gereinigte ATP-Synthase in Anwesenheit von DDM [383, 384]. Versuche mit der DDM-ATP-Synthase zeigten nämlich, dass dann CF_1F_0 nur noch unvollständig gespalten wird und die CF_1F_0 -Bande im BN-Gel dominiert (Daten nicht gezeigt). Die Kombination DDM/CBBG scheint daher weniger aggressiv als die Kombination Triton X-100/CBBG zu sein. Für die 2D-Kristallisation waren viele präparative BN-Gele mit anschließender Elektroelution notwendig. Beim

Vergleich von SDS-Gelelen der Eluate war häufig festzustellen, dass die Untereinheiten III und IV am besten erkennbar sind (siehe Abb. 4.2 auf S. 28). Die Stiel-Untereinheiten I und II sind vermutlich nur in substöchiometrischen Mengen in dieser Präparation vorhanden. Daher kann von den vorgestellten Verfahren wohl nur die Natriumthiocyanat-Spaltung mit anschließender Chromatographie intaktes CF₀ liefern (siehe Abb. 4.8).

4.1.5 Eigene Arbeiten zum Themengebiet

- [383]: Poetsch, A., H. Seelert, J. Meyer zu Tittingdorf und N. A. Dencher (1999) Detergent effect on anion exchange perfusion chromatography and gel filtration of intact chloroplast H⁺-ATP synthase, Biochem. Biophys. Res. Commun. 265: 520-524.
- [384]: Seelert, H., A. Poetsch, M. Rohlf und N. A. Dencher (2000) Dye-ligand chromatographic purification of intact multisubunit membrane protein complexes: application to the chloroplast H⁺-F₀F₁-ATP synthase, Biochem. J. 346: 41-44.
- [391]: Poetsch, A., D. Neff, H. Seelert, H. Schägger und N. A. Dencher (2000) Dye removal, catalytic activity and 2D crystallization of chloroplast H⁺-ATP synthase purified by blue native electrophoresis, Biochim. Biophys. Acta 1466: 339-349.
- [220]: Seelert, H., A. Poetsch, N.A. Dencher, A. Engel, H. Stahlberg und D.J. Müller (2000) Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor, Nature 405: 418-419.
- [413]: Rexroth, S., J. M. W. Meyer zu Tittingdorf, F. Krause, N. A. Dencher und H. Seelert (2003) Thylakoid membrane at altered metabolic state: Challenging the forgotten realms of the proteome, Electrophoresis 24: 2814-2823.
- [435]: Poetsch, A., S. Rexroth, J. Heberle, T.A. Link, N.A. Dencher und H. Seelert (2003) Characterisation of subunit III and its oligomer from spinach chloroplast ATP synthase, Biochim. Biophys. Acta 1618: 59-66.
- [446]: Seelert, H., N.A. Dencher und D.J. Müller (2003) Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase, J. Mol. Biol. 333: 337-344.
- [219]: Rexroth, S., J.M. Meyer zu Tittingdorf, H.J. Schwaßmann, F. Krause, H. Seelert, und N.A. Dencher (2004) Dimeric H⁺-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*, Biochim. Biophys. Acta 1658: 202-211.
- [415]: Meyer zu Tittingdorf, J. M. W., S. Rexroth, E. Schäfer, R. Schlichting, C. Giersch, N. A. Dencher und H. Seelert (2004) The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in *Chlamydomonas reinhardtii* is not affected by the metabolic state, Biochim. Biophys. Acta 1659: 92-99.
- [392]: Krause, F. und H. Seelert (2008) Detection and Analysis of Protein-Protein Interactions of Organellar and Prokaryotic Proteomes by Blue Native and Colorless Native Gel Electrophoresis, in Current Protocols in Protein Science (Hrsg.: Coligan, J. E., Dunn, B. M., Speicher, D. W. und Wingfield, P. T.) John Wiley and Sons, Inc., Supplement 51, UNIT 14.11: 1-36; wiederveröffentlicht als UNIT 19.18.
- [428]: Suhai, T., N. A. Dencher, A. Poetsch und H. Seelert (2008) Remarkable stability of the proton translocating F₁F₀-ATP synthase from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, Biochim. Biophys. Acta 1778: 1131-1140.
- [132]: Seelert, H. und F. Krause (2008) Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels, Electrophoresis 29: 2617-2636.

4.2 Struktur und Funktion von ATP-Synthasen

4.2.1 Aufbau und enzymatische Aktivität der Chloroplasten-ATP-Synthase

Untereinheit III und ihr Oligomer

Für die Umwandlung des elektrochemischen Protonengradienten ist in der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat die Untereinheit III von entscheidender Bedeutung. Durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wird sie als einzelnes Protein mit einer molaren Masse von 8003 g/mol (gemäß MALDI-Massenspektrometrie) erhalten [435]. Bei milderer Prozeduren, z.B. durch SDS-Inkubation von CF_1F_0 , bleibt das Oligomer III_{14} intakt und kann in reiner Form in mg-Mengen isoliert werden (siehe Abb. 4.7 auf S. 35). Wenn aber dieses Oligomer mittels MALDI-Massenspektrometrie untersucht werden soll, zerfällt es vermutlich bei der Ionisierung, und nur das Monomer III_1 ist nachweisbar [435]. Um das Oligomer auch während solcher Messungen erhalten zu können, ist eine Massenspektrometrie-Methode mit noch milderer Ionisierung erforderlich, wie die erst kürzlich entwickelte Variante „laser-induced liquid bead ion desorption“ [175]. Hiermit konnten andere Arbeitsgruppen die dreizehn Untereinheiten des homologen Oligomers in alkaliphilen Bakterien nachweisen [447].

Durch eine Kombination unterschiedlicher Messmethoden lassen sich Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede des Monomers und Oligomers von Untereinheit III zuverlässig ermitteln. So zeigen sowohl die Fourier-Transform-Infrarot- als auch die Circular dichroismus-Spektroskopie bei Mono- und Oligomer die vorwiegend α -helikale Sekundärstruktur von III [435]. Interessanterweise ändert sich beim Monomer aber die Struktur abhängig vom Lösungsmittel. Bei der Ermittlung der Sekundärstruktur in 1% SDS ist der α -Helixanteil von III_1 und III_{14} noch ähnlich, aber beim Verdünnen auf 0,5% SDS erniedrigt sich der Anteil nur beim Monomer deutlich [435]. Daher ist die Konformation einer einzelnen Untereinheit im Oligomer wohl durch Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert. Hier könnte die Änderung der Konformation nur für die jeweilige Untereinheit III von Bedeutung sein, die in Kontakt mit der Untereinheit IV tritt und dabei Protonen austauscht.

Der periphere Stiel photosynthetischer ATP-Synthasen

In Chloroplasten und Cyanobakterien bildet ein Heterodimer aus den Untereinheiten I+II bzw. $b+b'$ den peripheren Stiel der ATP-Synthase. Für die jeweiligen Untereinheiten wird angenommen, dass sie durch Genduplikation eines Vorläufers (Untereinheit b aus Bakterien) entstanden sind [283]. Trotz gleicher Ausgangssequenz haben sich I und II aber zu sehr verschiedenen Proteinen entwickelt, von denen nur II bzw. b' als homolog zur bakteriellen b -Untereinheit angesehen wird [448]. Während Untereinheit II der Chloroplasten-ATP-Synthase schon durch heterologe Expression in Bakterien in größeren Mengen isoliert werden konnte [448], fehlte für I eine geeignete Isolierungsprozedur. Die Ionenaustausch-Chromatographie in Anwesenheit des Detergens Zwittergent 3-12 ermöglichte die Abtrennung und Reinigung von Untereinheit I aus Spinat- CF_1F_0 [449]. Durch Fourier-Transform-Infrarot- sowie Circular dichroismus-Spektroskopie konnte der α -Helixanteil der so erhaltenen Untereinheit I mit der heterolog exprimierten Untereinheit II verglichen werden. Dabei ergaben sich 67% α -Helix für Untereinheit I, aber nur 41% für II [449]. Für den Zusammenhalt der beiden Untereinheiten des peripheren Stiels sollen sogenannte „coiled-coil“-Bereiche wichtig sein, also zwei Einzelhelices, die umeinander zu einem Doppelwendel gewunden sind. Daher wurde mittels unterschiedlicher Computerprogramme untersucht, welche Ausschnitte der Aminosäuresequenz für solche Wechselwirkungen in Frage kommen. Für Untereinheit I ergaben sich drei hydrophobe helikale Bereiche, während II nur zwei derartige Regionen zeigt [449]. Ein weiterer Unterschied zwischen I und II zeigt sich im Carboxy-terminalen Bereich. Hier befinden sich zwei positiv geladene Aminosäuren in Untereinheit II mitten in einer hydrophoben Region. Diese Aminosäuren sind aber nicht nur in Spinat vorhanden sondern auch in anderen photosynthetischen Organismen [449].

Der zentrale Stiel der Chloroplasten-ATP-Synthase

Die Untereinheiten γ und ϵ sind in der Chloroplasten-ATP-Synthase nicht nur als rotierendes Element bei der katalytischen Funktion von entscheidender Bedeutung. In CF_1F_0 steuern sie auch den Verlauf der Katalyse durch effiziente Unterbindung einer unerwünschten Hydrolyse von ATP. Für diese regulatorische Funktion scheint auch eine Konformationsänderung von ϵ wichtig zu sein und zwar von zwei α -Helices am Carboxy-Terminus (siehe Abschnitt 3.5.1 S. 18). Um Wechselwirkungen von ϵ mit anderen Untereinheiten zu zeigen, erfolgte eine Inkubation mit Quervernetzern (Maleimid-Succinimidylester), die Aminogruppen mit Sulfhydrylgruppen verbinden [450]. In Voruntersuchungen hatte sich diese Molekülklasse als geeigneter gegenüber Quervernetzern mit zwei gleichen funktionellen Gruppen herausgestellt. Die gewählten Moleküle können also Lysinreste bzw. den Amino-Terminus mit Cysteinresten vernetzen, wobei die Distanz durch unterschiedliche lange Abstandhalter (0,15—1,46 nm) vorgegeben wird. Durch Western-Blotting konnte ermittelt werden, dass ϵ in Kontakt mit den Untereinheiten III und γ tritt [450]. Die Massenspektrometrie erlaubte dann die genauere Aussage, welche Aminosäuren vernetzt wurden. Abhängig von den Bedingungen kommt der Cysteinrest 6 von ϵ entweder in Kontakt mit Lysinrest 48 von Untereinheit III oder aber mit einer bislang noch nicht identifizierten Aminosäure in Untereinheit γ [450]. Die Anwesenheit von Nukleotiden führt dazu, dass sich der Amino-Terminus von ϵ sowohl von Untereinheit III als auch von γ entfernt. Wenn hingegen Magnesium-Ionen zugegeben werden, wird der Cysteinrest 6 von ϵ eher mit γ verknüpft und bewegt sich von der Untereinheit III weg [450]. Neben dem Carboxy-Terminus von ϵ scheint also auch der Amino-Terminus bei der Regulation wichtig zu sein.

Für die Charakterisierung der Funktion von ATP-Synthasen wird häufig die ATP-Hydrolyse als Maß der Aktivität ermittelt. Dies ist besonders in nativen Gelen nützlich, da sich durch die Inkubation dieser Gele in geeigneten Testlösungen schnell Banden mit ATPase-Aktivität identifizieren lassen. Wenn nun aber dieser Test für die Chloroplasten-ATP-Synthase durchgeführt werden soll, z.B. zum schnellen Auffinden der CF_1F_0 -Bande, ist die starke Hemmung der Hydrolyseaktivität durch Untereinheit ϵ ein großer Nachteil. Die bei diesem Test weiß-gefärbten Banden in nativen Gelen sind äußerst schwach bis nicht erkennbar. Zur Lösung dieses Problems wurde die bisher bekannte Prozedur [451] in zwei Punkten optimiert: Verbesserung der Empfindlichkeit und Aufhebung der Hemmung durch ϵ [452]. Die Empfindlichkeit ließ sich dadurch verbessern, dass nach der Standardmethode, bei der weißes Bleiphosphat entsteht, das Gel zusätzlich für nur ca. 10 s in Ammoniumsulfidlösung eingelegt wird. Durch diesen kurzen Inkubationsschritt werden aus schwachen weißen Banden dunkle Bleisulfid-Banden [452]. Um bei photosynthetischen ATP-Synthasen die latente ATPase-Funktion in eine ATP-Hydrolyse-Aktivität umzuwandeln, sind verschiedene Prozeduren beschrieben, durch welche ϵ aus der ATP-Synthase entfernt wird [272]. Es wurden mehrere Verfahren getestet, so war bei der Identifizierung des Dimers der Chloroplasten-ATP-Synthase auch das Versetzen der Inkubationslösung mit 20% Methanol erfolgreich [219]. Als beste Variante erwies sich aber die Zugabe von Detergenzien, wobei mit Taurodesoxycholat die Hemmung durch ϵ am effektivsten aufgehoben werden kann [452].

4.2.2 Stöchiometrie des Oligomers der Untereinheit c/III

Stöchiometrie des Oligomers der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat

Für die Chloroplasten-ATP-Synthase ist schon seit Ende der 1980er Jahre bekannt, dass Untereinheit III ein Oligomer bildet, welches auch in denaturierenden SDS-Gelen identifiziert werden kann [433, 434]. Beim Versuch, dieses Oligomer elektronenmikroskopisch zu untersuchen, wurden lange kettenförmige Strukturen („Strings“) gefunden. Solche Strings lassen sich reproduzierbar erhalten (siehe z.B. die linearen Aggregate in Abb. 3.5 auf S. 12) und ordnen sich teilweise auch zu Stapeln an. Leider kann daraus aber nur ungefähr die Größe des Oligomers bestimmt werden [433]. Aussagen über die Form sind schwieriger, da dieses Oligomer für eine Einzelpartikelanalyse zu klein ist und durch die hohe Hydrophobizität viele Detergensmoleküle das Oligomer umgeben und strukturelle Details überdecken. Wenn hingegen die Ketten untersucht werden, erkennt man keine Unterscheidung der einzelnen Segmente.

Nur bei solchen Strings, bei denen vollständige ATP-Synthase als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde, kann an Hand der CF₁-Teile eine Abgrenzung abgeschätzt werden.

Erst nach dem Einbau in eine Lipiddoppelschicht bei geeigneten Protein-zu-Lipid-Verhältnissen sind Rückschlüsse auf die Form des Oligomers möglich. So zeigten die ersten Raster-Kraft-mikroskopischen Studien an der Chloroplasten-ATP-Synthase ringförmige Strukturen [197]. An eigenen Proben konnten solche Strukturen mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden [391]. Jeder dieser Oligomer-Ringe ist nun aus einer bestimmten Anzahl an Monomeren (bzw. „Protomere“: Protein-Monomere) der Untereinheit III zusammengesetzt. Die akzeptierte Lehrmeinung hierzu war, dass 9 oder 12 Monomere das Oligomer bilden und somit 3 oder 4 Protonen für die Synthese eines ATP-Moleküls über die Membran transportiert werden. Daher war es überraschend, als zunächst von der Gruppe des Nobelpreisträgers J.E. Walker eine Stöchiometrie von 10 Untereinheiten im Oligomer der mitochondrialen ATP-Synthase aus Hefe publiziert wurden [242]. Zwar waren Ergebnisse aus meiner Doktorarbeit [178] parallel dazu eingereicht worden, allerdings wurde zunächst nicht geglaubt, dass in Spinat das Chloroplasten-Oligomer aus 14 Untereinheiten besteht. Vermutlich erst durch die Science-Veröffentlichung der 10 Untereinheiten in Hefe gelang es auch, das Manuskript der III₁₄-Stöchiometrie von Spinat zu publizieren [220]. Trotz der eindeutigen Resultate waren immer wieder Fragen aufgekomen, ob diese Anzahl womöglich ein Artefakt der Rekonstitution in Lipidmembranen darstellt.

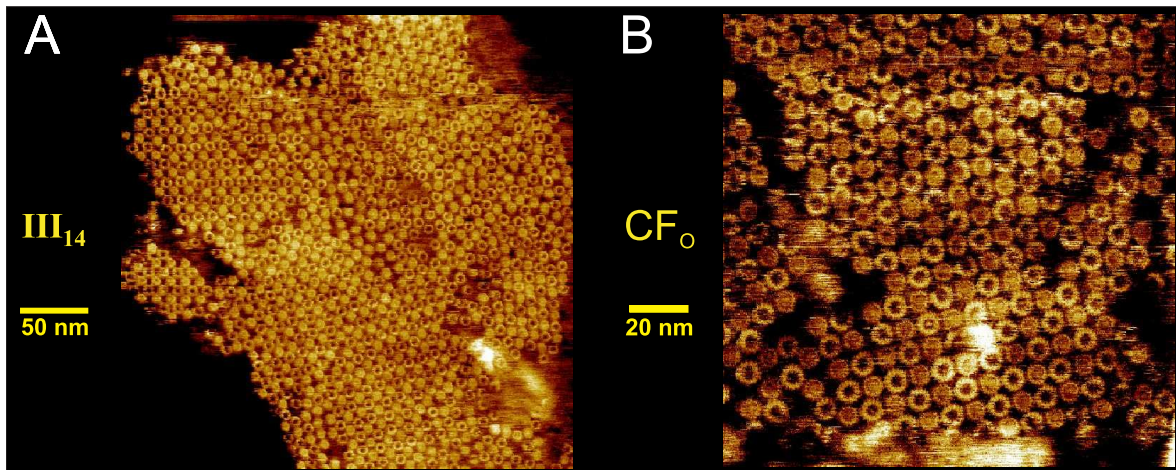


Abbildung 4.9: Raster-Kraft-Mikroskopie von 2D-Kristallisationsansätzen der ATP-Synthase aus Spinat. Unterschiedliche Subkomplexe der ATP-Synthase aus Spinat wurden mittels AFM untersucht, um die Stöchiometrie der Untereinheit III und mögliche Position der Untereinheit IV festzustellen. (A) zeigt eine Probe mit dem Oligomer III₁₄ und (B) einen Ansatz mit vollständigem CF₀. Die Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von D.J. Müller (BIOTEC, Dresden).

Da in [220] nur eine Methode zur Isolierung des Oligomers eingesetzt wurde und diese auch noch das denaturierende Detergens SDS beinhaltete, wurden alternative Proben unter milderer Bedingungen erzeugt. Am besten geeignet ist natürlich der Nachweis der Stöchiometrie an einer vollständigen ATP-Synthase. Leider ließen sich nach der 2D-Kristallisation von derartigen Ansätzen mit der AFM nur selten die Ring-Strukturen erkennen, wie z.B. bei F₁F₀ aus *T. elongatus* (siehe Abb. 4.10). Auch bei dem Versuch, aus 2D-Kristallen mit vollständiger ATP-Synthase den CF₁-Teil vor oder während der AFM zu entfernen, waren die erhaltenen Bilder nicht geeignet. Nur die Ringstruktur konnte erahnt werden, für ein Abzählen der Untereinheiten reichte die Auflösung nicht aus. Daher waren unterschiedliche Verfahren zu entwickeln bzw. optimieren, um ATP-Synthase-Teilkomplexe zu isolieren: über Dichtegradientenzentrifugation, präparative Elektrophorese oder Anionenaustausch-Chromatographie (siehe Abschnitt 4.1.4, ab S. 34). Diese Proben wurden mit unterschiedlichen Detergenzien und Lipiden gemischt, um hieraus beim Entfernen des Detergens 2D-Kristalle zu erhalten (siehe Abb. 3.5 auf S. 12). Durch Elektronenmikroskopie an negativ kontrastierten Präparaten unter Nutzung der Ausstattung am MPI für Biophysik

(Arbeitsgruppe von W. Kühlbrandt, Frankfurt) erfolgte dann die Auswahl von Proben für die Raster-Kraft-Mikroskopie. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die Vorauswahl schneller abläuft, denn so können innerhalb der gegebenen Messzeiten ca. 12 verschiedene Proben charakterisiert werden. Die ausgewählten Ansätze wurden dann zur Arbeitsgruppe von D.J. Müller (BIOTEC, Dresden) geschickt und von ihnen mittels AFM untersucht. 2D-Kristalle der Probe aus der Dichtegradientenzentrifugation enthielten nur das Oligomer der Untereinheit III. Bei den 2D-Kristallen des ATP-Synthase-Subkomplexes aus der präparativen BN-PAGE waren die Untereinheiten III und IV vorhanden. Eine Analyse der 2D-Kristalle der dritten Probe (Natriumthiocyanat-Spaltung und Anionenaustausch-Chromatographie) zeigte, dass hier alle CF₀-Untereinheiten anwesend waren. Das bedeutet, dass das chromatographische Verfahren wirklich eine vollständige CF₀-Präparation zur Verfügung stellt, die darüber hinaus auch während der Rekonstitution in Lipidmembran stabil ist. Durch die Raster-Kraft-Mikroskopie ergab sich, dass alle drei zuvor erwähnten Proben die gleiche III₁₄-Stöchiometrie aufweisen [446]. In den AFM-Topogrammen ließ sich direkt die Anzahl von 14 Untereinheiten III pro Oligomer der ATP-Synthase aus Spinat abzählen (siehe Abb. 4.9). Auch für die ATP-Synthase aus Rinderherz-Mitochondrien, Chloroplasten von *C. reinhardtii* sowie aus *T. elongatus* wurden 2D-Kristallisationsansätze vorbereitet. Meist zeigte aber schon die Elektronenmikroskopie mit Negativkontrastierung, dass diese Proben nicht für eine hochauflösende Strukturaufklärung geeignet sind. Die besten Strukturen konnten mit der ATP-Synthase aus *T. elongatus* erhalten werden, hier waren mit der AFM sogar die Ringstrukturen erkennbar (siehe Abb. 4.10). Aber auch diese reichten für die Analyse der Stöchiometrie nicht aus, ebenso erbrachten weiterführende Versuche von T. Suhai keine Verbesserungen [453]. Da bei der ATP-Synthase aus Spinat die 2D-Kristalle aber nicht nur für die AFM geeignet sind, wurden sie auch mittels Kryoelektronenmikroskopie in Zusammenarbeit mit J. Vonck (Arbeitsgruppe W. Kühlbrandt, MPI für Biophysik, Frankfurt) charakterisiert. Auch diese Analyse zeigte eindeutig die III₁₄-Stöchiometrie und darüber hinaus, dass jede Untereinheit III aus zwei α -Helices aufgebaut ist [198, 454].

Unabhängig von den eigenen Untersuchungen bestätigte die Gruppe von P. Gräber die III₁₄-Stöchiometrie mit der Raster-Kraft-Mikroskopie [455]. Mittlerweile haben die Gruppen von P. Fromme bzw. G. Groth auch dreidimensionale Kristalle des IIIer Oligomers aus Spinat erhalten, die ebenfalls die gleiche Stöchiometrie eines Tetradekamers zeigen [438, 456]. Allerdings ist die über strukturelle Aufklärung gefundene Stöchiometrie immer noch nicht im Einklang mit den funktionellen Daten. So lässt sich an Proteoliposomen mit der Chloroplasten-ATP-Synthase eine Stöchiometrie von 4 Protonen pro ATP messen, d.h. 12 Untereinheiten III pro Oligomer [457, 458]. Und auch Bestimmungen der Ionen/Substrat-Flüsse während der Belichtung von Pflanzenblättern lassen schlussfolgern, dass die Stöchiometrie von 14 abweicht [459]. Ein Grund für die Unterschiede zwischen der strukturellen und funktionellen Bestimmung der Stöchiometrie könnte darin liegen, dass biologische Systeme zwar präzise konzipiert sind, aber trotzdem bei Transportprozessen „Fehler“ auftreten [460]. Erst diese Fehler ermöglichen eine Anpassung von Organismen an unterschiedliche Bedingungen. Für die Chloroplasten-ATP-Synthase wurde beobachtet, dass sie unter bestimmten Bedingungen, Protonen direkt passieren lässt, der sogenannte Protonen-Schlupf [461]. So fließen Protonen über die Thylakoidmembran ohne direkte Kopplung mit der ATP-Synthese, wodurch das H⁺/ATP-Verhältnis verändert wird [462, 463].

Ein weiterer Punkt, der momentan noch in der Diskussion steht, ist die Anordnung der Untereinheiten in F₀. Bei Betrachtung der AFM-Bilder fällt auf, dass die Oligomer-Ringe mit kleinerem Durchmesser in einigen Proben leer, in anderen gefüllt sind [446]. Bestätigt wird dies durch die elektronenmikroskopische Analyse, bei der im Inneren eines Oligomers weitere Anzeichen für eine Elektronendichte vorhanden sind, die mit Untereinheit IV übereinstimmen könnte [198, 454]. Wenn man diese Befunde mit der Probenzusammensetzung vergleicht, ergibt sich eine direkte Korrelation zwischen den gefüllten Oligomeren und der Anwesenheit von Untereinheit IV. Daher scheint sich die Untereinheit IV in den Ansätzen im Inneren des Ringes aus IIIer Untereinheiten zu befinden, was dem in der Einleitung gezeigten Modell widerspricht (siehe Abb. 3.8 auf S. 16). Eine Erklärung für diese Position ist, dass sich Untereinheit IV nur unter den Bedingungen der 2D-Kristallisation in das Innere des im Vergleich zu anderen Organismen relativ großen Oligomers III₁₄ anordnet. Für die Gesamt-ATP-Synthase ist eine zentrale Position noch

schwerlich mit den Ergebnissen vieler anderer Forscher zu vereinbaren. So können Quervernetzungs-Experimente eine Verbindung zwischen zwei a-Untereinheiten (homolog zu IV) aufzeigen [464]. Auch aktuelle Befunde über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zeigen eindeutig, dass sich die Untereinheit a an der Peripherie des Oligomers befindet [465]. Ein anderer Grund, der als Ursache der gefüllten Ringe diskutiert wird, ist die Anwesenheit von Lipiden im Inneren des Oligomers [466]. Bei den eigenen Proben spricht aber die Korrelation mit der Menge an Untereinheit IV dagegen, sowie der Befund, dass auch eine Phospholipase-Behandlung die Masse im Inneren nicht entfernen kann [446].

Variabilität der Stöchiometrie im Oligomer der Untereinheit III

Bei der nun für Spinat gefundenen Stöchiometrie III_{14} ergibt sich kein ganzzahliges H^+/ATP -Verhältnis mehr. Außerdem unterscheiden sich die bisher identifizierten Stöchiometrien der verschiedenen Organismen. Daher ist es fraglich, wodurch die Menge an Monomeren im Oligomer festgelegt wird [244]. Eine weitere Frage in diesem Zusammenhang war, ob die Stöchiometrie in ein und demselben Organismus unterschiedliche Werte in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen annehmen kann. Hierzu hatten Schemidt *et al.* festgestellt, dass eine unterschiedliche Expressionsrate des Gens für Untereinheit c in *E. coli* auch zu einer Veränderung der Stöchiometrie führt [249] und sich die Anzahl an Untereinheiten im Oligomer auch mit den Wachstumsbedingungen ändert [250]. Demgegenüber zeigten Ergebnisse ebenfalls an *E. coli*, dass die Primärstruktur der c-Untereinheit die Stöchiometrie festlegt, was keine metabolische Variation der Ringgröße erlaubt [248]. Für letzteren Befund sprechen auch eigene Ergebnisse. Wenn nämlich die AFM-Bilder der Chloroplasten-ATP-Synthase sowie der ATP-Synthase aus *Ilyobacter tartaricus* genauer untersucht werden, stellt man fest, dass es nicht nur vollständige Oligomere gibt. Es sind auch defekte Protonenturbinen in den 2D-Gittern vorhanden, bei denen eine oder mehrere Untereinheiten fehlen [467]. Aber trotz der fehlenden Untereinheiten bleiben die Oligomere im Durchmesser gleich, nur die Form ist kein Ring mehr sondern ein Bogen. Somit ergibt sich die Folgerung, dass die Form eines Monomers der Untereinheit III die resultierende Zylindergröße und dadurch auch die Stöchiometrie im Oligomer festlegt [467].

Am Beispiel der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde überprüft, ob sich bei der Chloroplasten-ATP-Synthase die Anzahl an Monomeren im Oligomer der Untereinheit III mit den Wachstumsbedingungen ändert [406, 409]. *C. reinhardtii* erscheint als gutes Modellsystem, da zum Beispiel für CF_1 bekannt ist, dass sich die Anzahl der Untereinheiten α und β durch einen Rückkopplungsmechanismus reguliert [468]. Zunächst erfolgte die Kontrolle, ob eine Änderung von Kultivierungsbedingungen tatsächlich weitergehende metabolische Veränderungen hervorruft. Dazu wurde z.B. die Änderung der Chlorophyll- und Stärkekonzentration der entsprechenden Algenkulturen bei Variation der Lichtintensität, des pH-Werts oder der Kohlenstoffquelle bestimmt [406]. Aber auch auf Proteomebene blieb das Bandenmuster von 2D-Gelen mit nativer erster und denaturierender zweiter Dimension nicht gleich. Bei der Gegenüberstellung von Gelen mit photoautotroph und photomixotroph gewachsenen *C. reinhardtii* zeigte sich eine Änderung in der Organisation von Photosystem I und seinen Lichtsammel-Komplexen [413]. Um nun die Auswirkungen auf das Oligomer III_x in CF_0 verfolgen zu können, musste eine Methode eingesetzt werden, bei der möglichst schnell unterschiedliche Stöchiometrien festgestellt werden können. Die 2D-Kristallisation liefert zwar exakte Ergebnisse, ist aber für den Vergleich unterschiedlicher Kulturen sehr aufwändig. Eine gelbasierte Analyse mit hochauflösenden Gradientengelen erwies sich als geeignet. Als Resultat dieser Arbeit ergab sich, dass die Stöchiometrie von III_x auch unter deutlich geänderten metabolischen Bedingungen konstant bleibt [415]. Mittlerweile konnten neue Experimente für *E. coli* mit Hilfe der Quervernetzung von Untereinheit c ebenfalls eine konstante Stöchiometrie darlegen [469, 470]. Für Na^+ -ATP-Synthasen änderte sich bei unterschiedlichen Umweltbedingungen zwar die Expression der c-Untereinheit, nicht aber die c_{11} -Stöchiometrie [471]. Und auch bei thermoalkaliphilen Bakterien bleibt die Stöchiometrie konstant, und zwar bei c_{13} [472]. Durch die Gradientengelmethode kann nicht nur eine Änderung der Anzahl an Monomeren im Oligomer festgestellt werden. Zusätzlich erlaubt die Methode eine direkte Aussage über die Stöchiometrie, in dem ein Vergleich mit einem geeigneten Massenstandard

vorgenommen wird. Diese Arbeiten sind zur Zeit noch für *C. reinhardtii* und andere Algen sowie Cyanobakterien in Bearbeitung (Manuskript in Vorbereitung).

Stöchiometrie des Oligomers der Untereinheit III/c verschiedener Organismen

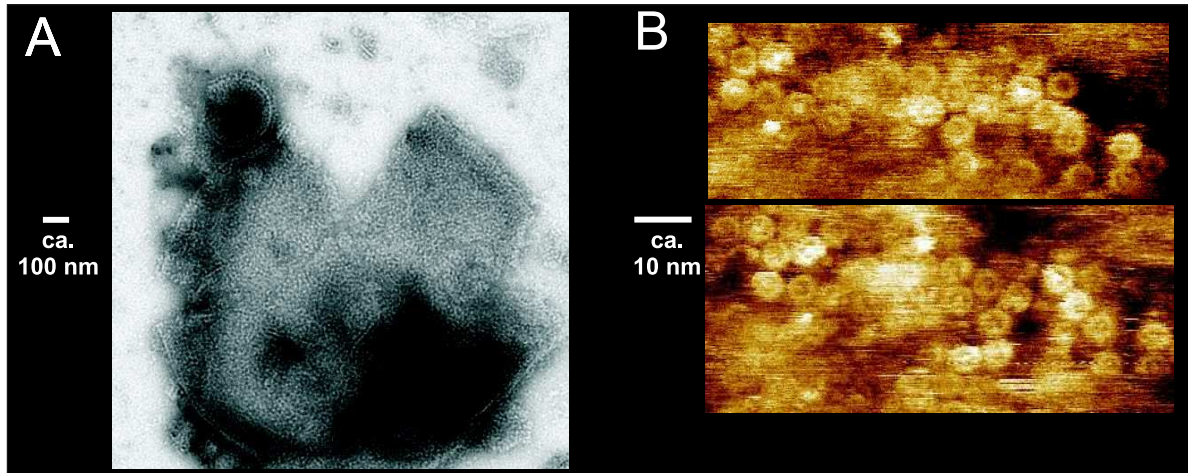


Abbildung 4.10: Raster-Kraft- und Elektronenmikroskopie-Bilder von 2D-Kristallisationsansätzen der ATP-Synthase aus *T. elongatus*. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen an negativ kontrastierten Proben eines Ansatzes zur 2D-Kristallisation konnte aus der Anwesenheit typischer F_1F_0 -Strukturen (lineare und 2D-Aggregate) die strukturelle Intaktheit der ATP-Synthase bestätigt werden (A). In den AFM-Bildern des gleichen Ansatzes erkennt man den Oligomer-Zylinder (B).

Neben der Lehrbuch-Meinung von 9 oder 12 Untereinheiten gingen schon im Jahr 2000 die Vermutungen zur Stöchiometrie von III bzw. c weit auseinander [241]. Mittlerweile sind zu diesen Daten, die oft auf kinetischen Messungen oder proteinbiochemischen Ansätzen basierten, auch Strukturdaten hinzugekommen. Diese strukturellen Informationen haben den Vorteil, dass die Anzahl an Untereinheiten direkt erkennbar ist. Andererseits ist aber auch eine Rückkopplung zu den biochemisch orientierten Gruppen vorhanden, um die vorhandenen Methoden zu optimieren bzw. alte Experimente neu zu bewerten. So ist nach dem Ergebnis aus der Röntgenkristallographie, dass das Oligomer der Hefe aus zehn Untereinheiten besteht [242], für den Modellorganismus *E. coli* basierend auf älteren Daten die gleiche Stöchiometrie gezeigt worden [473]. Inzwischen bestätigen aktuelle Experimente mit chemischer Quervernetzung, dass in *E. coli* dieses c_{10} -Oligomer vorliegt [470]. Auch der thermophile *Bacillus* PS3 verfügt über zehn Monomere im Oligomer [474]. Ein Monomer mehr besitzt die Na^+ -ATP-Synthase aus *Ilyobacter tartaricus* [475], von der auch eine Röntgenstruktur mit 2,4-Å-Auflösung bekannt ist [440]. Neben *Ilyobacter* sind c_{11} -Oligomere auch in *Propionigenium modestum* [439], *Clostridium paradoxum* [476] und *Acetobacterium woodii* [477] gefunden worden. Bemerkenswerterweise verwenden alle diese zuletzt aufgeführten Organismen Na^+ als Ion des elektrochemischen Gradienten für die ATP-Synthase. Die Stöchiometrie als Undekamer könnte also ein Kennzeichen der Na^+ -ATP-Synthasen sein, die auch eine ähnliche Sequenz für die Koordination der Na^+ -Ionen besitzen [478]. Dagegen besteht das Oligomer einer als Na^+ -Pumpe arbeitenden Vakuolen-ATPase aus *Enterococcus hirae* nur aus zehn Monomeren [479].

Die der Lehrbuch-Meinung entsprechende Stöchiometrie von zwölf Untereinheiten konnte bisher noch nicht in F-Typ-ATP-Synthasen nachgewiesen werden. Aber einige Bakterien verfügen in ihrer Plasmamembran über Enzymkomplexe zur ATP-Synthase, die eher Vakuolen-ATPasen ähneln. Ein Beispiel hierfür ist *Thermus thermophilus*, in dessen V-ATPase sich ein c_{12} -Oligomer befindet [480]. Für die c_{13} -Stöchiometrie lag zunächst nur eine Vorhersage aus der Genomsequenzierung vor. Bei dem Archaeon *Methanopyrus kandleri* soll das komplette Oligomer in einer einzigen Sequenz kodiert sein, so dass alle Monomere zu einer Einheit verschmolzen sind [245]. Mittlerweile konnten ebenso auf der Proteinebene Oligomere

aus dreizehn Untereinheiten gefunden werden, und zwar für den thermoalkaliphilen *Bacillus* sp. TA2.A1 [447, 481].

Die c_{13} -Stöchiometrie findet sich auch in photosynthetischen Organismen wieder. Bei den c-Oligomeren aus Cyanobakterien kommen Stöchiometrien im Bereich von 13 bis 15 Untereinheiten vor [437]. Das III_{14} -Oligomer der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat passt ebenfalls in diesen Bereich und bestätigt damit die Verwandtschaft der photosynthetischen Organismen. Zunächst wurde in Cyanobakterien die c_{15} -Stöchiometrie gefunden. Das Modellsystem hierfür war *Spirulina platensis* [436], deren Protonenrotor kürzlich strukturell mit einer Auflösung von 2,1 Å aufgeklärt werden konnte [482]. Mit diesem großen Bereich von 10 bis 15 Monomeren ist die Frage nach dem Prinzip, weshalb sich eine bestimmte Stöchiometrie ergibt, noch nicht beantwortet. Ein wichtiger Punkt scheint die Art zu sein, wie das Oligomer in der ATP-Synthase zur Rotation gebracht wird. Nach der chemi-osmotischen Theorie sollten das Membranpotential sowie der Unterschied in den Protonenkonzentrationen, also $\Delta\Psi$ und ΔpH , äquivalente Komponenten sein [12]. Bei photosynthetischen Organismen weiß man, dass ein recht hoher pH-Gradient zu Verfügung steht, z.B. 1,8 bis 2,1 pH-Einheiten in der Thylakoidmembran [483]. Daher liegt es nahe, dass dieser Gradient für die Chloroplasten-ATP-Synthase entscheidend ist [484], während in Mitochondrien $\Delta\Psi$ am wichtigsten ist. Wenn also in Mitochondrien eine geringe und in Chloroplasten eine hohe Anzahl an Monomeren im Oligomer vorliegt, könnte die Stöchiometrie eine Anpassung auf die Art des „Kraftstoffs“ für die ATP-Synthase sein. Allerdings wird auch in Chloroplasten der elektrischen Komponente $\Delta\Psi$ eine wichtige Rolle bei der Speicherung der Protonen-motorischen Kraft zugeschrieben [485]. Daher stellt sich die Frage, ob $\Delta\Psi$ und ΔpH tatsächlich äquivalent sind [480, 486]. Einige Ergebnisse weisen darauf hin, dass $\Delta\Psi$ von allen ATP-Synthasen gebraucht wird und somit das Membranpotential die Haupttriebkraft für die Rotation des Oligomers ist [487]. So scheinen die Komponenten der Protonen-motorischen Kraft kinetisch nicht äquivalent zu sein [486].

4.2.3 Supramolekulare Organisation der ATP-Synthase

Dimere der mitochondrialen ATP-Synthase

Bei der Analyse der nativen Gele des Vergleichs zwischen photoautotroph und photomixotroph gewachsenen *C. reinhardtii* konnte neben den Chloroplasten-Proteinen (inklusive CF_1F_O) auch die mitochondriale ATP-Synthase identifiziert werden [413]. Allerdings war auf den BN-Gelen die Komplex-V-Bande im Bereich deutlich höherer Massen als für ein MF_1F_O -Monomer zu erwarten war. An Hand der Massenstandards ergab sich, dass es sich bei der Bande wohl um das Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase handelt, also um $(MF_1F_O)_2$ [413]. Zusammen mit dem im gleichen Jahr von einer anderen Arbeitsgruppe veröffentlichten Untersuchung [488] sind dies die ersten Belege für ein stabiles Dimer $(MF_1F_O)_2$ in Algen. Bei höheren Pflanzen hingegen (*Arabidopsis thaliana*, Kartoffeln, Bohnen und Gerste) ist das mitochondriale ATP-Synthase Dimer nur bei geringen Detergens-Konzentrationen stabil [489]. Ein Grund für die Stabilität des Dimers könnte seine Untereinheiten-Zusammensetzung sein. So weiß man mittlerweile, dass der mitochondrialen ATP-Synthase aus Algen zwar einige typische Untereinheiten des peripheren Stiels fehlen, sie dafür allerdings bislang nicht identifizierte Untereinheiten besitzt [490]. Die speziellen Proteine befinden sich nicht nur in *C. reinhardtii*, sondern auch in anderen Algen, wie in der engverwandten Art *Polytomella* sp. Im Gegensatz zu *C. reinhardtii*, bei der die Mitochondrien aufwändig von den Chloroplasten getrennt werden müssen, ist *Polytomella* sp. eine farblose Variante und wächst nur heterotroph [490]. Da die Sequenz der Untereinheiten aus beiden Algen recht ähnlich ist, eignet sich die ATP-Synthase aus *Polytomella* sp. sehr gut als Modellsystem [491]. Bei *Polytomella* sp. ist das ATP-Synthase-Dimer nicht nur die stabilere Form, sondern $(MF_1F_O)_2$ ist auch die aktive Form der ATP-Synthase [492]. An diesem System ließ sich durch die Einzelpartikelanalyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen ein erster Einblick in den Aufbau des Dimers erzielen [493].

Neben der Struktur des *Polytomella*-Dimers erschien im gleichen Jahr eine Studie, bei der in analoger Weise das Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase aus Rinderherz untersucht wurde [494]. Ein

großer Unterschied dieser beiden Untersuchungen war der Bindungswinkel zwischen den einzelnen ATP-Synthasen. So betrug der Winkel bei Rind 40° [494] und bei *Polytomella* 70° [493]. Durch den 70°-Winkel ist die wesentliche Kontaktstelle zwischen zwei ATP-Synthasen der membranintegrale Bereich, während die F_1 -Teile entfernt voneinander sind. Die Bedeutung der Kontaktstelle in F_0 belegen auch gelelektrophoretische Analysen, die eine direkte Verbindung zwischen den α -Untereinheiten aufzeigen [464]. Nachfolgende Untersuchungen bestätigten den 70°-Winkel nicht nur für *Polytomella* sondern auch für Hefe [495]. Da für das Dimer eine wichtige Funktion bei der Bildung der mitochondrialen Cristae-Strukturen vorgeschlagen wird (z.B. [496]), ist neben der Einzelpartikelanalyse isolierter $(MF_1F_0)_2$ die Untersuchung im zellulären Kontext von großer Bedeutung. Wenn daher Proben unterschiedlicher Komplexität verglichen werden, sollte das Ergebnis an Einzelmolekülen mit dem der Organellen übereinstimmen. Eine derartige Bestätigung für den 70°-Winkel findet sich auch in Hefe, bei der isolierte Dimere eine vergleichbare Struktur zur ATP-Synthase in Sphäroblasten aus Mitochondrien besitzen [497]. So sind in intakten Mitochondrien wohl lange Ketten aus ATP-Synthase-Dimeren vorhanden [371]. Auch durch die AFM konnte die Existenz solcher Kettenstrukturen bestätigt werden [498]. Nach den Untersuchungen an modifizierten Mitochondrien wie den oben erwähnten Sphäroblasten richtet sich nun der Fokus auf die intakten Organellen. Bei derartigen Analysen erweisen sich die Fortschritte in der Kryo-Elektronentomographie als großer Vorteil. Durch diese Technik können bestimmte Proteinkomplexe in ganzen Organellen mittels Bildanalyse identifiziert werden. Damit ist es mittlerweile auch möglich, Ketten von ATP-Synthase-Dimeren in den Mitochondrien zu lokalisieren [499]. Mit einem optimierten Elektronenmikroskop lässt sich eine Auflösung der reihenartigen Organisation von ca. 6 nm erreichen [500].

Dimere der Chloroplasten-ATP-Synthase

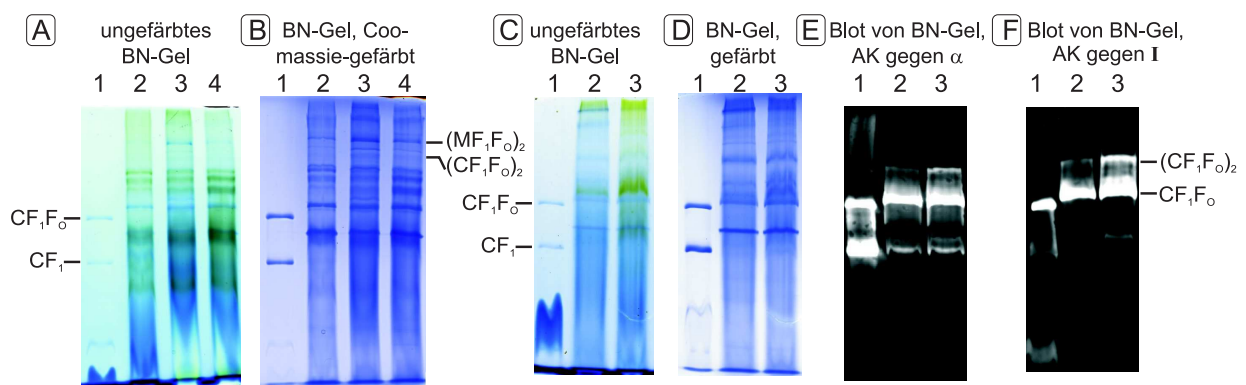


Abbildung 4.11: Identifizierung von Dimeren der Chloroplasten-ATP-Synthase aus *C. reinhardtii* und Spinat. In (A) und (B) wurden auf ein BN-Gel Digitonin-Solubilisate von *C. reinhardtii*-Kulturen aufgetragen, A: Gel direkt nach der BN-PAGE, B: gleiches Gel mit Coomassie R-250 gefärbt. Aufgetragen sind die Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat als Referenz (Spur 1), Chloroplasten einer mixotrophen Anzucht (Spur 2), Mitochondrien einer mixotrophen Anzucht (Spur 3) und Chloroplasten/Mitochondrien-Mischung einer autotrophen Anzucht (Spur 4). Die BN-Gele (C) bis (F) zeigen Digitonin-Solubilisate von Spinat-Proben, C: Gel direkt nach der BN-PAGE, D: gleiches Gel mit Coomassie R-250 gefärbt, E: Nachweis der Untereinheit α auf einer Blotmembran des BN-Gels mittels Meerrettich-Peroxidase/Chemilumineszenz, F: Nachweis der Untereinheit I. Aufgetragen sind die Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat als Referenz (Spur 1), Mitochondrien-Fraktion aus Spinat (Spur 2), Chloroplasten-Fraktion aus Spinat (Spur 3).

Im Gegensatz zu den sehr stabilen Dimeren der mitochondrialen ATP-Synthase aus Algen, war die Existenz von F_1F_0 -Dimeren in Chloroplasten und Bakterien lange umstritten. Auch die eigenen Untersuchungen an *C. reinhardtii* ergaben zunächst nur eine Bande für das Monomer der Chloroplasten-ATP-Synthase [413]. Da aber Proteinkomplexe oft recht empfindlich sind, muss die Isolierungsprozedur dieser

Problematik angepasst sein. Zwar wurden schon milde Detergenzien bei der Solubilisierung eingesetzt (Digitonin), aber um fragile Komplexe intakt zu erhalten, müssen natürlich auch die anderen Schritte der Präparation schonend sein. Ein ganz wichtiger Punkt in diesem Zusammenhang ist der Aufschluss der Zellen. Die verwendete Zellwand-Mutante von *C. reinhardtii* lässt sich leichter aufschließen als der Wildtyp, erfordert aber trotzdem noch Drücke von 180 bar [413]. Gerade für die Chloroplasten-ATP-Synthase wurde berichtet, dass sie sehr druckempfindlich ist [501]. Daher wurde nach einer milderen Variante gesucht und zunächst der Druck auf 90 bar halbiert [219]. Mit diesem schonenden Aufschluss sinkt zwar die Proteinausbeute, aber $\text{CF}_1\text{F}_\text{O}$ bleibt besser erhalten. Darüber hinaus konnten erstmals Dimere der Chloroplasten-ATP-Synthase nachgewiesen werden [219]. In nativen Gelen kann es als Bande mit doppelter Masse des Monomers (ca. 1300 kDa) etwas unterhalb des mitochondrialen Dimers (ca. 1700 kDa) identifiziert werden (siehe Abb. 4.11 Gele (A) und (B)). Wenn statt der Druckbehandlung *C. reinhardtii* mit Glasperlen stark geschüttelt wird, erfolgt das Aufbrechen der Zellen sehr effizient, und auch dann ist das Dimer nachweisbar [502]. Das Bandenmuster von Monomer und Dimer scheint im denaturierenden Gel identisch zu sein, es unterscheidet sich aber sehr deutlich von dem mitochondrialen Dimer. Während also für die mitochondriale ATP-Synthase zusätzliche Untereinheiten als Kontaktfläche im Dimer wichtig sind, konnten beim $\text{CF}_1\text{F}_\text{O}$ -Dimer bisher keine spezifischen neuen Untereinheiten identifiziert werden.

Dass das Chloroplasten-Dimer weniger stabil als sein Pendant aus Mitochondrien ist, zeigten schon die Analysen mittels nativer Elektrophorese bei der Optimierung der Isolierungsprozedur. Neben dem Druck haben aber auch Ionen einen Einfluss auf die Stabilität. So führt die Zugabe steigender Mengen von Vanadat oder Phosphat-Ionen dazu, dass der Anteil an $\text{CF}_1\text{F}_\text{O}$ -Dimer immer weiter sinkt, während die Menge an $(\text{MF}_1\text{F}_\text{O})_2$ konstant bleibt [219]. Beim Versuch, diesen Effekt auch mit anderen Ionen (z.B. Molybdat) zu erzielen, änderte sich die Menge beider Dimere nicht. Da somit die Art des Ions entscheidend für den Zerfall des $\text{CF}_1\text{F}_\text{O}$ -Dimers ist, lohnt sich die Überlegung zu möglichen Bindestellen von Vanadat und Phosphat. Als Zielort kommt vor allem der CF_1 -Teil in Frage, da hier die Phosphatbindung zur Herstellung von ATP erforderlich ist und Vanadat ein Inhibitor zu dieser Bindestelle ist. In einem vorläufigen Modell sollten daher wichtige Kontaktstellen des Chloroplasten-Dimers in CF_1 liegen, im Gegensatz zu den Kontakten in F_O bei $(\text{MF}_1\text{F}_\text{O})_2$ [219].

Um eine physiologische Bedeutung des Dimers der Chloroplasten-ATP-Synthase nachweisen zu können, sollten Unterschiede des Monomer/Dimer-Verhältnisses bei geänderten Wachstumsbedingungen festgestellt werden. Hierfür wurde wie schon zuvor (siehe Abschnitt 4.2.2 ab S. 42) *C. reinhardtii* bei photoautotrophen und photomixotrophen Bedingungen kultiviert werden. Bei diesen Bedingungen war die Stöchiometrie der Protomere von Untereinheit III gleich geblieben (Abschnitt 4.2.2). In Hinblick auf die supramolekulare Organisation der Chloroplasten-ATP-Synthase zeigten aber native Gelen einen deutlichen Unterschied. Am besten erkennbar war dies an der Dimer-Menge im Gel: beim photomixotrophen Wachstum gab es mehr Dimere als in der photoautotrophen Kultur [502]. Um diese Änderung exakter quantifizieren zu können, wurden die beiden Kulturen mit stabilen Isotopen markiert und der Anteil der Isotope dann massenspektrometrisch analysiert. Durch die Zugabe von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als Stickstoffquelle für die photoautotrophe Kultur, im Gegensatz zur photomixotrophen Kultur mit „normalem“ Ammoniumchlorid (also vorwiegend ^{14}N) erfolgte die Markierung. Über die MALDI-Massenspektrometrie war eine eindeutige Zuordnung der Proteine beider Kulturen und auch die Quantifizierung möglich [502]. Diese Analyse bestätigte den höheren Anteil an Dimer in der photomixotrophen Kultur. Darüber hinaus zeigt sich, dass die Dimere wohl aus schon vorhandenen Monomeren gebildet werden und somit eine metabolische Regulation des Anteils an $(\text{CF}_1\text{F}_\text{O})_2$ vorliegt [502]. Die Dimerisierung eröffnet dabei die Möglichkeit, die Aktivität der ATP-Synthase zu regulieren.

Bei späteren Untersuchungen gab es teilweise Probleme, das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase reproduzierbar zu erhalten [453]. Mittlerweile hat sich die Belichtung als entscheidender Faktor herausgestellt. Die zuvor beschriebenen Kulturen [219, 502] wuchsen in einem Licht-Dunkel-Rhythmus. Dagegen waren bei den neueren Kulturen Dauerlichtbedingungen verwendet worden, um ein schnelleres Wachstum zu erreichen. Gleichzeitig sinkt dadurch aber der Anteil an $(\text{CF}_1\text{F}_\text{O})_2$, was ebenfalls eine Regulation der ATP-Synthase-Aktivität sein könnte. Neben *C. reinhardtii* wurden auch bei anderen pho-

tosynthetischen Organismen nach Dimeren gesucht. Indizien für ein Chloroplasten-ATP-Synthase-Dimer gibt es zum Beispiel bei Spinat (siehe Abb. 4.11 Gele (C) bis (F)). Hier konnte sowohl mit Antikörpern gegen CF₁-Untereinheiten als auch mit solchen gegen CF₀ eine Bande mit deutlich höherer Masse als das Monomer festgestellt. Diese Untersuchungen werden zur Zeit in Zusammenarbeit mit N.G. Heidrich fortgesetzt (Manuskript in Vorbereitung).

4.2.4 Eigene Arbeiten zum Themengebiet

- [391]: Poetsch, A., D. Neff, H. Seelert, H. Schägger und N. A. Dencher (2000) Dye removal, catalytic activity and 2D crystallization of chloroplast H⁺-ATP synthase purified by blue native electrophoresis, *Biochim. Biophys. Acta* 1466: 339-349.
- [220]: Seelert, H., A. Poetsch, N.A. Dencher, A. Engel, H. Stahlberg und D.J. Müller (2000) Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor, *Nature* 405: 418-419.
- [467]: Müller, D.J., N.A. Dencher, T. Meier, P. Dimroth, K. Suda, H. Stahlberg, A. Engel, H. Seelert und U. Matthay (2001) ATP synthase: constrained stoichiometry of the transmembrane rotor, *FEBS Lett.* 504: 219-222.
- [413]: Rexroth, S., J. M. W. Meyer zu Tittingdorf, F. Krause, N. A. Dencher und H. Seelert (2003) Thylakoid membrane at altered metabolic state: Challenging the forgotten realms of the proteome, *Electrophoresis* 24: 2814-2823.
- [435]: Poetsch, A., S. Rexroth, J. Heberle, T.A. Link, N.A. Dencher und H. Seelert (2003) Characterisation of subunit III and its oligomer from spinach chloroplast ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1618: 59-66.
- [446]: Seelert, H., N.A. Dencher und D.J. Müller (2003) Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase, *J. Mol. Biol.* 333: 337-344.
- [415]: Meyer zu Tittingdorf, J.M.W., S. Rexroth, E. Schäfer, R. Schlichting, C. Giersch, N. A. Dencher und H. Seelert (2004) The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in *Chlamydomonas reinhardtii* is not affected by the metabolic state, *Biochim. Biophys. Acta* 1659: 92-99.
- [219]: Rexroth, S., J.M.W. Meyer zu Tittingdorf, H.J. Schwaßmann, F. Krause, H. Seelert und N.A. Dencher (2004) Dimeric H⁺-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta* 1658: 202-211.
- [449]: Poetsch, A., R. J. Berzborn, J. Heberle, T. A. Link, N. A. Dencher und H. Seelert (2007) Biophysics and Bioinformatics Reveal Structural Differences of the Two Peripheral Stalk Subunits in Chloroplast ATP Synthase, *J. Biochem.* 141: 411-420.
- [450]: Gertz, M., H. Seelert, N. A. Dencher und A. Poetsch (2007) Interactions of rotor subunits in the chloroplast ATP synthase modulated by nucleotides and by Mg²⁺, *Biochim. Biophys. Acta* 1774: 566-574.
- [502]: Schwaßmann, H. J., S. Rexroth, H. Seelert und N. A. Dencher (2007) Metabolism controls dimerization of the chloroplast F₀F₁ ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *FEBS Lett.* 581, 1391-1396.
- [198]: Seelert, H., D. N. Dani, S. Dante, T. Hauß, F. Krause, E. Schäfer, M. Frenzel, A. Poetsch, S. Rexroth, H. J. Schwaßmann, T. Suhai, J. Vonck, und N. A. Dencher (2009) From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1787: 657-671.

erfolgt dann für alle Atmungskettenkomplexe, so dass darauf zurückgeschlossen werden kann, wie diese Komplexe supramolekular organisiert sind (in Abb. 4.12 wurden exemplarisch einige Banden beschriftet). Beim Vergleich der Rinderherzmitochondrien mit den pflanzlichen Proben zeigt sich die Ähnlichkeit im Aufbau der Superkomplexe. Daher ist nicht nur der Aufbau der Einzelkomplexe bei sehr verschiedenen Lebewesen konserviert, sondern auch ihre Organisation über Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dadurch, dass in den gefundenen Strukturen auch Komplex IV der Atmungskette enthalten ist, handelt es sich bei den Superkomplexen entsprechend dem Modell nach [368] um Respirasomen.

Welcher Superkomplex aber der dominierende ist, unterscheidet sich von Organismus zu Organismus. Dies ist bei der Untersuchung von Grünalgen gegenüber dem Spinat feststellbar. Der Effekt der selektiven Solubilisierung durch Digitonin ist neben Spinat auch bei *Euglena gracilis* zu beobachten. Auch hier ist die Mitochondrienfraktion aus der Isolierungsvorschrift dunkelgrün gefärbt. Wenn diese Fraktion mit Digitonin solubilisiert wird, erweisen sich einige photosynthetische Proteinkomplexe als Digitonin-resistent und verbleiben bei der Abtrennung durch Zentrifugation im Sediment. Nach dem Auftragen des Überstands mit den solubilisierten Proteinen wandern verhältnismäßig wenig grüne Banden im Massenbereich der Atmungskettenkomplexe (siehe Probe 4 auf dem noch nicht zusätzlich gefärbten nativen Gel E in Abb. 4.12). Beim Vergleich mit dem Bandenmuster von *C. reinhardtii* (Probe 3 in Abb. 4.12) lässt sich dies gut nachvollziehen. Auch bei den mitochondrialen Proteinkomplexen sind deutliche Unterschiede vorhanden. So ist das Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase bei *C. reinhardtii* als intensive Bande vorhanden und bei *E. gracilis* kaum erkennbar (siehe Abb. 4.12). Dies zeigt, dass MF_1F_0 -Dimere nicht generell in allen Grünalgen stabil sind, sondern nur in den mit *C. reinhardtii*-verwandten Arten. Bei *E. gracilis* könnte die Organisation der mitochondrialen ATP-Synthase also eher mit der bei höheren Pflanzen vergleichbar sein, bei welchen $(\text{MF}_1\text{F}_0)_2$ empfindlich gegenüber der Behandlung mit Detergenzien ist [489]. Der individuelle Komplex I ist in *C. reinhardtii* sehr deutlich, wobei eine grün-gefärbte Bande mit etwas niedrigerer Masse aber ebenfalls NADH-Dehydrogenase-Aktivität zeigt. Hierbei wäre es möglich, dass ein Subkomplex von Komplex I zufälligerweise mit einem Chlorophyll-haltigen Proteinkomplex komigriert. Diese enzymatische Aktivität könnte aber auch auf eine pflanzliche NAD(P)H-Dehydrogenase zurückzuführen sein, die in *Arabidopsis* mit dem Photosystem I einen Superkomplex bildet [503, 504]. Bei den Atmungskettensuperkomplexen ist in *C. reinhardtii* eine Bande mit ähnlicher Masse wie I_1III_2 aus Rinderherz am prägnantesten. Diese Bande enthält vermutlich neben Komplex I auch III und IV [505, 506]. Zusätzlich gibt es eine schwächere Bande eines Superkomplexes mit etwas höherer Masse als $(\text{MF}_1\text{F}_0)_2$. Im Vergleich dazu ist in *E. gracilis* fast kein individueller Komplex I vorhanden, stattdessen bilden ein Komplex mit ähnlicher Masse wie I_1III_2 und ein Superkomplex x mit unbekannter Zusammensetzung die Hauptbanden (siehe Abb. 4.12, Manuskript in Vorbereitung). Bei Pflanzen, wie *Arabidopsis thaliana* [507] oder Mais [508], ist ebenfalls festgestellt worden, dass Komplex I überwiegend in Superkomplexen vorkommt. Eine Ausnahme bilden die Aronstabgewächse: hier ist Komplex I fast nur als Superkomplex I_1III_2 vorhanden und nicht in einem Komplex mit noch höherer Masse [509]. Eher seltener sind Superkomplexe aus Pflanzenmitochondrien, die auch Komplex IV enthalten, sie konnten in Kartoffeln identifiziert werden [510] (und Spinat wie oben beschrieben). Solche Respirasomen scheinen in Kartoffeln sehr stabil zu sein und ermöglichen einen erweiterten Einblick in den Aufbau der Atmungskette, die sogenannten „Megakomplexe“ [511].

4.3.2 Die Struktur und Aktivität von Superkomplexen der mitochondrialen Atmungskette von Rinderherz

Die Analyse der Superkomplexe im Gel liefert zwar schon Informationen über die Zusammensetzung und erlaubt qualitative Aussagen über die Aktivität, aber viele weitere Messungen werden durch die Anwesenheit einer Gelmatrix beeinträchtigt. So ist es zum Beispiel schwierig, quantitative Messungen der Enzymaktivität durchzuführen. Solche Analysen sind aber wichtig, um Aufschlüsse über die Funktion von Superkomplexen zu erhalten. Eine wichtige Funktion könnte ein effizienterer Transport von Substraten

sein, so dass diese direkt vom produzierenden zum verbrauchenden Enzymkomplex weitergeleitet werden. Beispielsweise findet in *E. coli* ein direkter Transfer von NADH aus einer Malat-Dehydrogenase zum Komplex I statt [512].

Um unabhängig von der Gelmatrix zu werden, wurde zunächst versucht, Superkomplexe auf alternativen Wegen in geeigneter Reinheit zu isolieren: durch Dichtegradienten-Zentrifugation [505] und durch Chromatographie [410, 513]. Allerdings resultierte bei keinem dieser zusammen mit J. Braun und A. Ulrich im Rahmen der Diplomarbeit sowie E. Schäfer im Rahmen der Dissertation an der TU Darmstadt durchgeführten Versuche eine hinreichend reine Fraktion mit möglichst nur einem Superkomplex. Daher blieb die native Gelelektrophorese auf Grund ihrer hervorragenden Trenneigenschaften die Methode der Wahl, mit der Notwendigkeit einer anschließenden Elution. Bei BN-Gelen empfiehlt sich eine Elektroelution (siehe Abb. 4.2 auf Seite 28). Mit diesen Proben kann verfolgt werden, welchen Einfluss die supramolekulare Organisation auf die Aktivität der entsprechenden Atmungskettenkomplexe hat. Die Aktivität von Komplex I ist im Superkomplex $I_1III_2IV_1$ deutlich höher als in I_1III_2 . Und für Komplex III ist im kleineren Superkomplex I_1III_2 kaum Aktivität messbar, während III in $I_1III_2IV_1$ wesentlich höhere Werte zeigt [514]. Diese Messungen belegen ähnlich wie spätere Untersuchungen anderer Gruppen [515], dass die im Gel vorhandenen Superkomplexe zusammenhängende funktionelle Einheiten bilden.

Um zu analysieren, ob die individuellen Komplexe tatsächlich in definierter Weise zu Superkomplexen zusammengefügt sind, wurden die aus den BN-Gelen eluierten Proben mit der Elektronenmikroskopie untersucht. Dabei dienten die in größeren Mengen verfügbaren Superkomplexe aus Rinderherzmitochondrien (I_1III_2 und $I_1III_2IV_1$) als Ausgangsmaterial einer Einzelpartikelanalyse [514]. Durch diese Untersuchungen konnten zwei Vorzugsorientierungen der beiden Superkomplexe auf den Trägernetzen für die EM erkannt werden: eine Aufsicht vom Intermembranraum ausgehend und eine Seitenansicht entlang der Membran. Entsprechend zu diesen Ansichten konnten die negativ-kontrastierten Partikel reproduzierbar klassifiziert werden und daraus gemittelte Bilder erstellt werden. Wenn nun diese Projektionsstrukturen der beiden Superkomplexe verglichen werden, ist die Differenz ein einzelner Komplex IV. Nach Erstellen einer solchen Differenzkarte [514] erfolgte der Vergleich der identifizierten Struktur mit der Röntgenstruktur der Cytochrom-c-Oxidase [516]. Tatsächlich ist Komplex IV immer in gleicher Weise mit den Komplexen I und dem Dimer von III zusammengefügt. Die somit erhaltenen Strukturen von I_1III_2 und $I_1III_2IV_1$ konnten dann mit der kurz zuvor publizierten Struktur des Superkomplexes I_1III_2 aus *Arabidopsis thaliana* verglichen werden [517]. Durch die Herkunft aus unterschiedlichen Organismen (Säugetier gegenüber Pflanze) variierten die Untereinheiten-Zusammensetzung sowie die Struktur der Komplexe. In Fortsetzung der Arbeiten an den beiden Superkomplexen konnte E. Schäfer auch eine 3D-Ansicht des größeren Komplexes $I_1III_2IV_1$ aus Rinderherz erstellen, in der die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten erkennbar sind [518].

Im Gegensatz zu Pflanzen und Säugetieren ist in der Bäckerhefe kein Komplex I vorhanden, dafür dominieren hier Wechselwirkungen zwischen den Komplexen III und IV [519]. Dabei sind an das Dimer von Komplex III meist eine bis zwei Kopien der Cytochrom-c-Oxidase gebunden. Solche Superkomplexe III_2IV_1 und III_2IV_2 konnten ebenfalls schon durch eine Einzelpartikel-Analyse charakterisiert werden [520]. Bei Pflanzen-Mitochondrien ist im Gegensatz zu den Atmungsketten-Komplexen aus Rinderherz häufig eine Assoziation anderer Proteine an diese Komplexe zu beobachten. Beispielsweise lässt sich in der Alge *Polytomella* und der Pflanze *Arabidopsis* die Carboanhydrase angelagert an Komplex I lokalisieren [521, 522]. Außerdem ist die Carboanhydrase in Mais auch in der Einzelpartikel-Struktur des Superkomplexes I_1III_2 identifizierbar [508].

Bei den zuvor erwähnten Megakomplexen aus Kartoffeln konnten mehrere einzelne Strukturen von Superkomplexen zu einer größeren Gesamtstruktur zusammengefügt werden [511]. Die Analyse beruht ebenfalls auf der Elektronenmikroskopie mit der Zuordnung negativ kontrastierter Einzelpartikel. Als Grundlage dienen die Strukturen der Superkomplexe I_1III_2 , III_2IV_1 , $I_1III_2IV_1$ und des ATP-Synthase-Dimers aus Kartoffeln, wobei als komplett neue Struktur der Komplex I_2III_2 hinzu kommt [511]. Solche Wechselwirkungen, die dazu führen, dass zwei Komplexe I als Dimer identifiziert werden können, waren schon in der Pflanze *Arabidopsis* [489] beobachtet worden. Auch in Pilzen sind Komplex-I-Dimere

zu finden: in *Podospira anserina* [523], *Neurospora crassa* [524] und *Yarrowia lipolytica* [525]. Aus der Strukturinformation über den Aufbau der einzelnen Superkomplexe kann nun auf die Anordnung in einem der größten Bausteine des Respirasoms, dem Komplex I₂III₂IV₂, und seiner Zusammenlagerung zu langen Ketten geschlossen werden [511].

Auf verschiedenen Wegen ist also feststellbar, dass in der Atmungskette sehr viele einzelne Proteinkomplexe zu einer größeren Einheit assembliert sind. Fraglich ist nur, ob diese Wechselwirkungen sehr fest sind, wie es das „Solid-state“-Modell vorhersagt, oder die Zusammensetzung doch entsprechend bioenergetischer Notwendigkeiten variiert („Plasticity“-Modell [355]). Neben den Proteinkomponenten spielen bei solchen großen Komplexen aber auch andere Bestandteile eine wichtige Rolle. So wurde in der Einleitung schon der Einfluss von Lipidmolekülen erwähnt, im eng gedrängten Innenraum der biologischen Zelle könnten aber auch Ribonukleinsäuren und Ionen an der Ausbildung sehr großer Makromolekülstrukturen beteiligt sein [526]. Eine vergleichbare Organisation wie in der mitochondrialen Atmungskette ist ebenso bei der Photosynthese wieder zu finden. Hier sind die Photosysteme über große Reichweiten hinweg organisiert [527], was sich beispielsweise über die AFM visualisieren lässt [528]. Und auch ganze zusammengehörige Stoffwechselwege, wie beispielsweise die zyklische Photophosphorylierung, können eine Einheit bilden. So konnte ein solcher Komplex, bestehend aus dem Photosystem I, Lichtsammelkomplexen, Cytochrom *b₆f*, der Ferredoxin-NADP-Reduktase und einem zusätzlichen Membranprotein, kürzlich in *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen werden [529].

4.3.3 Eigene Arbeiten zum Themengebiet

- [413]: Rexroth, S., J. M. W. Meyer zu Tittingdorf, F. Krause, N. A. Dencher und H. Seelert (2003) Thylakoid membrane at altered metabolic state: Challenging the forgotten realms of the proteome, *Electrophoresis* 24: 2814-2823.
- [85]: Krause, F., N.H. Reifschneider, D. Vocke, H. Seelert, S. Rexroth, und N.A. Dencher (2004) “Respirasome”-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach, *J. Biol. Chem.* 279: 48369-48375.
- [514]: Schäfer, E., H. Seelert, N.H. Reifschneider, F. Krause, N.A. Dencher und J. Vonck (2006) Architecture of Active Mammalian Respiratory Chain Supercomplexes, *J. Biol. Chem.* 281: 15370-15375.
- [392]: Krause, F. und H. Seelert (2008) Detection and Analysis of Protein-Protein Interactions of Organellar and Prokaryotic Proteomes by Blue Native and Colorless Native Gel Electrophoresis, in *Current Protocols in Protein Science* (Hrsg.: Coligan, J. E., Dunn, B. M., Speicher, D. W. und Wingfield, P. T.) John Wiley and Sons, Inc., Supplement 51, UNIT 14.11: 1-36; wiederveröffentlicht als UNIT 19.18.
- [198]: Seelert, H., D. N. Dani, S. Dante, T. Hauß, F. Krause, E. Schäfer, M. Frenzel, A. Poetsch, S. Rexroth, H. J. Schwaßmann, T. Suhai, J. Vonck, und N. A. Dencher (2009) From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer’s disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1787: 657-671.

5 Ausblick

Zum Verständnis der Funktionsweise von Proteinen und ihrer Interaktion mit pharmakologisch wichtigen Substanzen bilden hochauflösende Einblicke in die Struktur eine wichtige Grundlage. Trotz der zentralen Rolle von ATP-Synthasen bei der Energieumwandlung in der Atmungskette und der Photosynthese ist deren Gesamtstruktur immer noch nicht mit ausreichender Auflösung bekannt. Sogar die Anordnung der membranintegralen Untereinheiten ist nicht zweifelsfrei bewiesen. Im Rahmen meiner Forschung ließen sich strukturelle Details des membranintegralen Bereichs klären, wie die Stöchiometrie von Untereinheit III. Bei einer Verbesserung der Auflösung von AFM- oder EM-Bildern der vollständigen ATP-Synthase könnte aber auch die Position der Untereinheit IV im Vergleich zu III sichtbar gemacht werden, sowie die Anzahl der Helices in Untereinheit IV, was beides bislang unbekannt ist. Zusätzlich eignen sich die ATP-Synthase-Proben aus den selbst etablierten Vorschriften für die „normale“ Kristallisation mit anschließender Röntgenstrukturanalyse. Zwar wurden schon Vorversuche in dieser Richtung durchgeführt, aber durch Nutzung von Pipittierrobotern ließen sich deutlich mehr Kristallisationsparameter variieren, um so hochgeordnete Kristalle zu erhalten. Bei der ATP-Synthase aus Spinat stehen für entsprechende Ansätze geeignete Mengen an Proben zur Verfügung. Für die ATP-Synthase aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* müssten die Möglichkeiten der Miniaturisierung ausgeschöpft werden, um Mengen von wenigen Milligramm auf umfangreiche Testserien aufzuteilen. Allerdings könnte die höhere Stabilität der cyanobakteriellen ATP-Synthase diese Tests vereinfachen. So führte die Kristallisation der Photosysteme aus *T. elongatus* schon deutlich eher zu hochaufgelösten Strukturen als die der Homologe aus Pflanzen.

Für die Isolierung empfindlicher Proteinkomplexe stellt die native Gelelektrophorese mit anschließender Elution eine hervorragende Verbesserung zu den bisherigen Standardverfahren dar. Wenn bei der chromatographischen Reinigung kein intakter Proteinkomplex resultiert (z.B. wie bei der ATP-Synthase aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*) können stattdessen durch die hochauflösende Trennung im Gel Proteinkomplexe sehr rein im Maßstab von mehreren Hundert Mikrogramm erhalten werden. Somit lassen sich dann Bestimmungen der enzymatischen Aktivität und strukturelle Analysen realisieren. Präparative native Gele werden sicherlich im Zusammenhang mit der Isolierung von Superkomplexen, z.B. aus der mitochondrialen Atmungskette, an Bedeutung gewinnen, um deren Funktion und Struktur aufzuklären. So sind für den Nachweis einer Substratkanalisierung umfassende Messungen nötig, und in Bezug auf die ATP-Synthase müsste ermittelt werden, ob das Monomer oder ein Oligomer die enzymatisch aktive Form darstellt. Außerdem kann dann die Frage geklärt werden, welche Rolle die Superkomplexe für den Organismus spielen. Änderungen der Superkomplex-Zusammensetzung sind beispielsweise bei Erkrankungen oder Alterungsprozessen erwähnt worden. Diese Veränderungen können sehr deutliche Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität und somit auf die korrekte Funktionsweise haben, was aber bislang noch nicht quantitativ untersucht wurde. Zusätzlich unterstützt eine Stukturaufklärung mit höheren Auflösungen als bei bisherigen Untersuchungen die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen und ermöglicht es auch festzustellen, ob Superkomplexe in Kontakt mit weiteren Proteinen treten. Vor allem im zellulären Kontext einer intakten Membran sind noch weitere funktionelle und strukturelle Analysen großer Proteinkomplexe erforderlich, beispielsweise um solche Wechselwirkungen *in vivo* zu zeigen. Durch zeitaufgelöste Messungen ließe sich ermitteln, ob die in Gelen beobachteten Superkomplexe wirklich die vorherrschende Anordnung in Membranen sind, ob sie dauerhaft stabil sind oder ob eine dynamische Reorganisation stattfindet. Ein solcher Prozess könnte bei der Steuerung der Chloroplasten-ATP-Synthase von Bedeutung sein, wie durch die Dimere aus *C. reinhardtii* demonstriert wurde. Bei den Chloroplasten-ATP-Synthase-Dimeren ist auch noch zu klären, ob sie wirklich universell vorkommen und ob es zusätzlich beteiligte Proteine gibt, die vielleicht die Dimerisierung steuern.

Literaturverzeichnis

- [1] LUISI, Pier: Overview on primitive membranes. In: *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 26 (1996), 272-273.
- [2] RAUCHFUSS, Horst: *Chemische Evolution und der Ursprung des Lebens*. Berlin, Heidelberg, New York : Springer Verlag, 2005.
- [3] WHITE, S. H. ; HEIJNE, G. von: How translocons select transmembrane helices. In: *Annu. Rev. Biophys.* 37 (2008), S. 23-42.
- [4] DE WEER, P.: A century of thinking about cell membranes. In: *Annu. Rev. Physiol.* 62 (2000), S. 919-26.
- [5] SINGER, S. J. ; NICOLSON, G. L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. In: *Science* 175 (1972), S. 720-31.
- [6] SINGER, S. J.: Some early history of membrane molecular biology. In: *Annu. Rev. Physiol.* 66 (2004), S. 1-27.
- [7] JACOBSON, K. ; SHEETS, E. D. ; SIMSON, R.: Revisiting the fluid mosaic model of membranes. In: *Science* 268 (1995), S. 1441-2.
- [8] VEREB, G. ; SZÖLLÖSI, J. ; MATKO, J. ; NAGY, P. ; FARKAS, T. ; VIGH, L. ; MÁTYUS, L. ; WALDMANN, T. A. ; DAMJANOVICH, S.: Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003), S. 8053-8.
- [9] ENGELMAN, D. M.: Membranes are more mosaic than fluid. In: *Nature* 438 (2005), S. 578-80.
- [10] DUPUY, A. D. ; ENGELMAN, D. M.: Protein area occupancy at the center of the red blood cell membrane. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008), S. 2848-52.
- [11] WALLIN, E. ; HEIJNE, G. von: Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. In: *Protein Sci.* 7 (1998), S. 1029-38.
- [12] MITCHELL, P.: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. In: *Nature* 191 (1961), 144-8.
- [13] OVERINGTON, J. P. ; AL-LAZIKANI, B. ; HOPKINS, A. L.: How many drug targets are there? In: *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006), S. 993-6.
- [14] HOPKINS, A. L. ; GROOM, C. R.: The druggable genome. In: *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002), S. 727-30.
- [15] RUSS, A. P. ; LAMPEL, S.: The druggable genome: an update. In: *Drug Discov. Today* 10 (2005), S. 1607-10.
- [16] BENNETT, V. ; HEALY, J.: Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin. In: *Trends Mol. Med.* 14 (2008), S. 28-36.
- [17] SVEDBERG, The ; FÄHRÆUS, Robin: A new method for the determination of the molecular weight of the proteins. In: *J. Am. Chem. Soc.* 48 (1926), 430-438.
- [18] GREEN, D. E. ; LOOMIS, W. F. ; AUERBACH, V. H.: Studies on the Cyclophorase System .1. The Complete Oxidation of Pyruvic Acid to Carbon Dioxide and Water. In: *J. Biol. Chem.* 172 (1948), 389-403.
- [19] BRANDT, U.: Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). In: *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006), S. 69-92.
- [20] HENNING, U.: Multienzyme Complexes. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 5 (1966), 785-790.
- [21] REED, L. J. ; COX, D. J.: Macromolecular Organization of Enzyme Systems. In: *Annu. Rev. Biochem.* 35 (1966), 57-84.
- [22] BERNAL, J.D.: General introduction structure arrangements of macromolecules. In: *Discuss. Faraday Soc.* 25 (1958), S. 7 - 18.
- [23] SUND, H. ; WEBER, K.: Die Quartärstruktur der Proteine. In: *Angew. Chem.* 78 (1966), 217-232.
- [24] SRERE, PA: Heterologous protein - Protein interactions - Quinary structures. In: *METHODS-A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY* 19 (1999), S. 193.
- [25] EDELSTEIN, S. J.: Patterns in the quinary structures of proteins. Plasticity and inequivalence of individual molecules in helical arrays of sickle cell hemoglobin and tubulin. In: *Biophys. J.* 32 (1980), 347-360.
- [26] McCONKEY, E. H.: Molecular evolution, intracellular organization, and the quinary structure of proteins. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79 (1982), S. 3236-3240.
- [27] VÉLOT, C. ; MIXON, M. B. ; TEIGE, M. ; SRERE, P. A.: Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: a model for the metabolon. In: *Biochemistry* 36 (1997), 14271-14276.
- [28] TATULIAN, Suren A. ; QIN, Shan ; PANDE, Abhay H. ; HE, Xiaomei: Positioning membrane proteins by novel protein engineering and biophysical approaches. In: *J. Mol. Biol.* 351 (2005), 939-947.
- [29] SCHWEET, R. S. ; KATCHMAN, B. ; BOCK, R. M. ; JAGANNATHAN, V.: Pyruvic oxidase of pigeon breast muscle. II. Physioco-chemical studies. In: *J. Biol. Chem.* 196 (1952), S. 563-7.
- [30] SANADI, D. R. ; LITTLEFIELD, J. W. ; BOCK, R. M.: Studies on alpha-ketoglutaric oxidase. II. Purification and properties. In: *J. Biol. Chem.* 197 (1952), S. 851-62.

- [31] SRERE, P. A. ; MOSBACH, K.: Metabolic compartmentation: symbiotic, organellar, multienzymic, and microenvironmental. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 28 (1974), S. 61–83.
- [32] SRERE, P. A.: Complexes of sequential metabolic enzymes. In: *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987), S. 89–124.
- [33] SRERE, P. A.: Macromolecular interactions: tracing the roots. In: *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000), S. 150–3.
- [34] WINKEL, B. S.: Metabolic channeling in plants. In: *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (2004), S. 85–107.
- [35] JØRGENSEN, K. ; RASMUSSEN, A. V. ; MORANT, M. ; NIELSEN, A. H. ; BJARNHOLT, N. ; ZAGROBELNY, M. ; BAK, S. ; MØLLER, B. L.: Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* 8 (2005), S. 280–91.
- [36] ELLIS, R. J.: Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001), S. 114–9.
- [37] ELLIS, R. J.: Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. In: *Trends Biochem. Sci.* 26 (2001), S. 597–604.
- [38] MINTON, A. P. ; WILF, J.: Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: *Biochemistry* 20 (1981), S. 4821–6.
- [39] MINTON, A. P.: Implications of macromolecular crowding for protein assembly. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (2000), S. 34–9.
- [40] ZHOU, H. X. ; RIVAS, G. ; MINTON, A. P.: Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. In: *Annu. Rev. Biophys.* 37 (2008), S. 375–97.
- [41] LLOYD-DAVIES, K. A. ; MICHELL, R. H. ; COLEMAN, R.: Glycerylphosphorylcholine phosphodiesterase in rat liver. Subcellular distribution and localization in plasma membranes. In: *Biochem. J.* 127 (1972), S. 357–68.
- [42] KEMPNER, E. S. ; MILLER, J. H.: The molecular biology of *Euglena gracilis*. V. Enzyme localization. In: *Exp. Cell Res.* 51 (1968), S. 150–6.
- [43] KEMPNER, E. S. ; MILLER, J. H.: The molecular biology of *Euglena gracilis*. IV. Cellular stratification by centrifuging. In: *Exp. Cell Res.* 51 (1968), S. 141–9.
- [44] ALBERTS, B.: The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. In: *Cell* 92 (1998), S. 291–4.
- [45] GRASBERGER, B. ; MINTON, A. P. ; DELISI, C. ; METZGER, H.: Interaction between proteins localized in membranes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (1986), S. 6258–62.
- [46] HELMS, V.: Attraction within the membrane. Forces behind transmembrane protein folding and supramolecular complex assembly. In: *EMBO Rep.* 3 (2002), S. 1133–8.
- [47] SOMERHARJU, P. ; VIRTANEN, J. A. ; CHENG, K. H.: Lateral organisation of membrane lipids. The superlattice view. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1440 (1999), S. 32–48.
- [48] DAMJANOVICH, S. ; MATKO, J. ; MÁTYUS, L. ; SZABO, JR. G. ; SZÖLLÖSI, J. ; PIERI, J. C. ; FARKAS, T. ; GASPAR, JR. R.: Supramolecular receptor structures in the plasma membrane of lymphocytes revealed by flow cytometric energy transfer, scanning force- and transmission electron-microscopic analyses. In: *Cytometry* 33 (1998), S. 225–33.
- [49] BUZHYNSKY, N. ; HITE, R. K. ; WALZ, T. ; SCHEURING, S.: The supramolecular architecture of junctional microdomains in native lens membranes. In: *EMBO Rep.* 8 (2007), S. 51–5.
- [50] STAEHELIN, L. A.: Chloroplast membrane structure. Intramembranous particles of different sizes make contact in stacked membrane regions. In: *Biochim. Biophys. Acta* 408 (1975), S. 1–11.
- [51] GIDDINGS, T. H. ; WITHERS, N. W. ; STAEHELIN, L. A.: Supramolecular structure of stacked and unstacked regions of the photosynthetic membranes of *Prochloron* sp., a prokaryote. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 (1980), S. 352–356.
- [52] BOEKEMA, E. J. ; HANKAMER, B. ; BALD, D. ; KRUIP, J. ; NIELD, J. ; BOONSTRA, A. F. ; BARBER, J. ; RÖGNER, M.: Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995), S. 175–9.
- [53] DEKKER, J. P. ; BOEKEMA, E. J.: Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1706 (2005), S. 12–39.
- [54] SCHEURING, S. ; SEGUIN, J. ; MARCO, S. ; LEVY, D. ; ROBERT, B. ; RIGAUD, J. L.: Nanodissection and high-resolution imaging of the *Rhodospseudomonas viridis* photosynthetic core complex in native membranes by AFM. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003), S. 1690–3.
- [55] SCHEURING, S. ; STURGIS, J. N.: Chromatic adaptation of photosynthetic membranes. In: *Science* 309 (2005), S. 484–7.
- [56] SCHEURING, S.: AFM studies of the supramolecular assembly of bacterial photosynthetic core-complexes. In: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (2006), S. 387–93.
- [57] KIRCHHOFF, H. ; LENHART, S. ; BÜCHEL, C. ; CHI, L. ; NIELD, J.: Probing the organization of photosystem II in photosynthetic membranes by atomic force microscopy. In: *Biochemistry* 47 (2008), S. 431–40.
- [58] ALLEN, R. D. ; SCHROEDER, C. C. ; FOK, A. K.: An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. In: *J. Cell Biol.* 108 (1989), S. 2233–40.
- [59] SCHÄGGER, H.: Respiratory chain supercomplexes. In: *IUBMB Life* 52 (2001), S. 119–28.
- [60] SCHÄGGER, H.: Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1555 (2002), S. 154–9.
- [61] STROH, A. ; ANDERKA, O. ; PFEIFFER, K. ; YAGI, T. ; FINEL, M. ; LUDWIG, B. ; SCHÄGGER, H.: Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. In: *J. Biol.*

- Chem.* 279 (2004), S. 5000–7.
- [62] GENOVA, M. L. ; BARACCA, A. ; BIONDI, A. ; CASALENA, G. ; FACCIOLI, M. ; FALASCA, A. I. ; FORMIGGINI, G. ; SGARBI, G. ; SOLAINI, G. ; LENAZ, G.: Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? In: *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (2008), S. 740–6.
- [63] HELENIUS, A. ; SIMONS, K.: Solubilization of membranes by detergents. In: *Biochim. Biophys. Acta* 415 (1975), S. 29–79.
- [64] TANFORD, C. ; REYNOLDS, J. A.: Characterization of membrane proteins in detergent solutions. In: *Biochim. Biophys. Acta* 457 (1976), S. 133–70.
- [65] BARRERA, N. P. ; DI BARTOLO, N. ; BOOTH, P. J. ; ROBINSON, C. V.: Micelles protect membrane complexes from solution to vacuum. In: *Science* 321 (2008), S. 243–6.
- [66] WAINIO, W. W. ; ARONOFF, M.: Effect of some surface-active agents on cytochrome oxidase. In: *Arch. Biochem.* 57 (1955), S. 115–23.
- [67] SCHMIEDEBERG, O.: Untersuchungen über die pharmakologische wirksamen Bestandteile der *Digitalis purp.* L. In: *Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.* 3 (1875), S. 16–17.
- [68] KILIANI, H.: Ueber Digitonin. In: *Arch. Pharm.* 243 (1905), 5-12.
- [69] KILIANI, H.: Ueber Digitonin und Digitogenin. In: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 24 (1891), 339-347.
- [70] KILIANI, H.: Ueber die Zusammensetzung des Digitonins. In: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 23 (1890), 1555-1560.
- [71] RANSOM, F.: Saponin und sein Gegengift. In: *Deut. Med. Wochschr.* 27 (1901), S. 194–196.
- [72] WINDAUS, A.: Über die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. In: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 42 (1909), 238-246.
- [73] YAGI, S.: Über eine Saponin-Cholesterinverbindung. In: *Naunyn Schmiedeberts Arch. Pharmacol.* 64 (1910), 141-146.
- [74] TANSLEY, K.: The regeneration of visual purple: its relation to dark adaptation and night blindness. In: *J. Physiol. (Lond.)* 71 (1931), S. 442–58.
- [75] SMITH, E. L.: Solutions of Chlorophyll-Protein Compounds (Phyllochlorins) Extracted from Spinach. In: *Science* 88 (1938), S. 170–171.
- [76] COOPER, C. ; DEVLIN, T. M. ; LEHNINGER, A. L.: Oxidative phosphorylation in an enzyme fraction from mitochondrial extracts. In: *Biochim. Biophys. Acta* 18 (1955), S. 159–60.
- [77] LEHNINGER, A. L. ; WADKINS, C. L. ; COOPER, C. ; DEVLIN, T. M. ; GAMBLE, Jr. J. L. J. L.: Oxidative phosphorylation. In: *Science* 128 (1958), S. 450–6.
- [78] SIEKEVITZ, P. ; WATSON, M. L.: Some cytochemical characteristics of a phosphorylating digitonin preparation of mitochondria. In: *Biochim. Biophys. Acta* 25 (1957), S. 274–9.
- [79] SIMON, E. W.: The effect of digitonin on the cytochrome c oxidase activity of plant mitochondria. In: *Biochem. J.* 69 (1958), S. 67–74.
- [80] ANDERSON, J. M. ; BOARDMAN, N. K.: Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis. I. Chlorophyll contents and photochemical activities of particles isolated from spinach chloroplasts. In: *Biochim. Biophys. Acta* 112 (1966), S. 403–21.
- [81] ANDERSON, J. M. ; VERNON, L. P.: Digitonin incubation of spinach chloroplasts in tris (hydroxymethyl) methylglycine solutions of varying ionic strengths. In: *Biochim. Biophys. Acta* 143 (1967), S. 363–76.
- [82] GROSS, J. A. ; WOLKEN, J. J.: Two c-type cytochromes from light- and dark-grown *Euglena*. In: *Science* 132 (1960), S. 357–8.
- [83] KOUKOL, J. ; CHOW, C. T. ; VENNESLAND, B.: Photophosphorylation by digitonin-fragmented spinach chloroplasts. In: *J. Biol. Chem.* 234 (1959), S. 2196–201.
- [84] WESSELS, J. S.: Separation of the two photochemical systems of photosynthesis by digitonin fragmentation of spinach chloroplasts. In: *Biochim. Biophys. Acta* 65 (1962), S. 561–4.
- [85] KRAUSE, F. ; REIFSCHNEIDER, N. H. ; VOCKE, D. ; SEELERT, H. ; REXROTH, S. ; DENCHER, N. A.: "Respirasome"-like super-complexes in green leaf mitochondria of spinach. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2004), S. 48369–75.
- [86] ALMEIDA, M. V. ; LE HYARIC, M.: Carbohydrate-derived surfactants. In: *Mini-Rev. Org. Chem.* 2 (2005), 283-297.
- [87] FISCHER, Emil ; RASKE, Karl: Synthese einiger Glucoside. In: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 42 (1909), 1465-1476.
- [88] FISCHER, Emil ; HELFERICH, Burckhardt: Über neue synthetische Glucoside. In: *Justus Liebigs Ann. Chem.* 383 (1911), 68-91.
- [89] NOLLER, C. R. ; ROCKWELL, W. C.: The Preparation of Some Higher Alkylglucosides. In: *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938), 2076-2077.
- [90] PIGMAN, William W. ; RICHTMYER, Nelson K.: The Influence of Structural Changes in the Aglucons on the Enzymic Hydrolysis of Alkyl β -D-Glucosides. In: *J. Am. Chem. Soc.* 64 (1942), 369-374.
- [91] BURY, C. R. ; BROWNING, J.: Comparison of Ionic and Non-Ionic Detergents. In: *Trans. Faraday Soc.* 49 (1953), 209-211.
- [92] SHINODA, K. ; YAMAGUCHI, T. ; HORI, R.: The Surface Tension and the Critical Micelle Concentration in Aqueous Solution of β -D-Alkyl Glucosides and Their Mixtures. In: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 34 (1961), 237-241.
- [93] BARON, C. ; THOMPSON, T. E.: Solubilization of bacterial membrane proteins using alkyl glucosides and dioctanoyl phosphatidylcholine. In: *Biochim. Biophys. Acta* 382 (1975), S. 276–85.
- [94] DE GRIP, W. J. ; BOVEE-GEURTS, P. H. M.: Synthesis and properties of alkylglucosides with mild detergent action: improved synthesis and purification of β -1-octyl-, -nonyl-, and -decyl-glucose. Synthesis of β -1-undecylglucose and

- β -1-dodecylmaltose. In: *Chem. Phys. Lipids* 23 (1979), 321-335.
- [95] ROSEVEAR, P ; VANAKEN, T ; BAXTER, J ; FERGUSON-MILLER, S.: Alkyl glycoside detergents: a simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome c oxidase. In: *Biochemistry* 19 (1980), S. 4108-15.
- [96] WILLIS, M. S. ; KOTH, C. M.: Structural proteomics of membrane proteins: a survey of published techniques and design of a rational high throughput strategy. In: *Methods Mol. Biol.* 426 (2008), S. 277-95.
- [97] CUNNINGHAM, F ; DEBER, C. M.: Optimizing synthesis and expression of transmembrane peptides and proteins. In: *Methods* 41 (2007), S. 370-80.
- [98] DOBROVETSKY, E. ; MENENDEZ, J. ; EDWARDS, A. M. ; KOTH, C. M.: A robust purification strategy to accelerate membrane proteomics. In: *Methods* 41 (2007), S. 381-7.
- [99] MIDGETT, C. R. ; MADDEN, D. R.: Breaking the bottleneck: eukaryotic membrane protein expression for high-resolution structural studies. In: *J. Struct. Biol.* 160 (2007), S. 265-74.
- [100] DREW, D. ; NEWSTEAD, S. ; SONODA, Y. ; KIM, H. ; HEIJNE, G. von ; IWATA, S.: GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Nat. Protoc.* 3 (2008), S. 784-98.
- [101] LEWINSON, O. ; LEE, A. T. ; REES, D. C.: The funnel approach to the precrystallization production of membrane proteins. In: *J. Mol. Biol.* 377 (2008), S. 62-73.
- [102] JUNGE, F. ; SCHNEIDER, B. ; RECKEL, S. ; SCHWARZ, D. ; DÖTSCH, V. ; BERNHARD, F.: Large-scale production of functional membrane proteins. In: *Cell Mol. Life Sci.* 65 (2008), S. 1729-55.
- [103] KELLER, T. ; SCHWARZ, D. ; BERNHARD, F. ; DÖTSCH, V. ; HUNTE, C. ; GORBOULEV, V. ; KOEPSSELL, H.: Cell free expression and functional reconstitution of eukaryotic drug transporters. In: *Biochemistry* 47 (2008), S. 4552-64.
- [104] WUU, J. J. ; SWARTZ, J. R.: High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008), S. 1237-50.
- [105] FITZGERALD, D. J. ; SCHAFFITZEL, C. ; BERGER, P. ; WELLINGER, R. ; BIENIOSSEK, C. ; RICHMOND, T. J. ; BERGER, I.: Multiprotein expression strategy for structural biology of eukaryotic complexes. In: *Structure* 15 (2007), S. 275-9.
- [106] KASHINO, Y.: Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. In: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 797 (2003), S. 191-216.
- [107] MACHER, B. A. ; YEN, T. Y.: Proteins at membrane surfaces-a review of approaches. In: *Mol. BioSyst.* 3 (2007), S. 705-13.
- [108] SPEERS, A. E. ; WU, C. C.: Proteomics of integral membrane proteins-theory and application. In: *Chem. Rev.* 107 (2007), S. 3687-714.
- [109] SCHLUESENER, D. ; FISCHER, F. ; KRUIP, J. ; RÖGNER, M. ; POETSCH, A.: Mapping the membrane proteome of *Corynebacterium glutamicum*. In: *Proteomics* 5 (2005), S. 1317-30.
- [110] DOWELL, J. A. ; FROST, D. C. ; ZHANG, J. ; LI, L.: Comparison of two-dimensional fractionation techniques for shotgun proteomics. In: *Anal. Chem.* 80 (2008), S. 6715-23.
- [111] DOUCE, R. ; CHRISTENSEN, E. L. ; BONNER, JR. W. D. W. D.: Preparation of intact plant mitochondria. In: *Biochim. Biophys. Acta* 275 (1972), S. 148-60.
- [112] BERGMAN, A. ; GARDESTRÖM, P. ; ERICSON, I.: Method to Obtain a Chlorophyll-free Preparation of Intact Mitochondria from Spinach Leaves. In: *Plant Physiol.* 66 (1980), S. 442-445.
- [113] SCHWITZGUEBEL, J. P. ; SIEGENTHALER, P. A.: Purification of Peroxisomes and Mitochondria from Spinach Leaf by Percoll Gradient Centrifugation. In: *Plant Physiol.* 75 (1984), S. 670-674.
- [114] FORD, T. ; GRAHAM, J. ; RICKWOOD, D.: Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. In: *Anal. Biochem.* 220 (1994), S. 360-6.
- [115] GRAHAM, J. ; FORD, T. ; RICKWOOD, D.: The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of iodixanol. In: *Anal. Biochem.* 220 (1994), S. 367-73.
- [116] ERIKSSON, M. ; GARDESTRÖM, P. ; SAMUELSSON, G.: Isolation, Purification, and Characterization of Mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Plant Physiol.* 107 (1995), S. 479-483.
- [117] HÁJEK, Tomas ; HONYS, David ; ČAPKOVÁ, Vera: New method of plant mitochondria isolation and sub-fractionation for proteomic analyses. In: *Plant Science* 167 (2004), 389-395.
- [118] ISLINGER, M. ; LÜERS, G. H. ; ZISCHKA, H. ; UEFFING, M. ; VÖLKL, A.: Insights into the membrane proteome of rat liver peroxisomes: Microsomal glutathione-S-transferase is shared by both subcellular compartments. In: *Proteomics* 6 (2006), S. 804-16.
- [119] BOLDOGH, I. R. ; PON, L. A.: Purification and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Methods Cell Biol.* 80 (2007), S. 45-64.
- [120] MILLAR, A. H. ; LIDDELL, A. ; LEAVER, C. J.: Isolation and subfractionation of mitochondria from plants. In: *Methods Cell Biol.* 80 (2007), S. 65-90.
- [121] CUELLO, J. ; QUILES, M. J.: Fractionation of thylakoid membranes into grana and stroma thylakoids. In: *Methods Mol. Biol.* 274 (2004), S. 1-9.
- [122] EUBEL, H. ; HEAZLEWOOD, J. L. ; MILLAR, A. H.: Isolation and subfractionation of plant mitochondria for proteomic analysis. In: *Methods Mol. Biol.* 355 (2007), S. 49-62.

- [123] HAFERKAMP, S. ; KIRCHHOFF, H.: Significance of molecular crowding in grana membranes of higher plants for light harvesting by photosystem II. In: *Photosyn. Res.* 95 (2008), S. 129–34.
- [124] LANGE, M. Swiatek-de ; MÜLLER, B. ; UEFFING, M.: Native fractionation: isolation of native membrane-bound protein complexes from porcine rod outer segments using isopycnic density gradient centrifugation. In: *Methods Mol. Biol.* 484 (2008), S. 161–75.
- [125] STEINBACK, K. E. ; MULLET, J. E. ; ARNTZEN, C. J.: Fractionation of thylakoid membrane protein complexes by sucrose density-gradient centrifugation. In: EDELMANN, M. (Hrsg.) ; HALICK, R. B. (Hrsg.) ; CHUA, N. H. (Hrsg.): *Methods in chloroplast molecular biology*. Elsevier Biomedical Press, 1982, S. 863–872.
- [126] HUBER, C. G. ; WALCHER, W. ; TIMPERIO, A. M. ; TROIANI, S. ; PORCEDDU, A. ; ZOLLA, L.: Multidimensional proteomic analysis of photosynthetic membrane proteins by liquid extraction-ultracentrifugation-liquid chromatography-mass spectrometry. In: *Proteomics* 4 (2004), S. 3909–20.
- [127] ACKERMAN, S. H. ; TZAGOLOFF, A.: Methods to determine the status of mitochondrial ATP synthase assembly. In: *Methods Mol. Biol.* 372 (2007), S. 363–77.
- [128] KASTNER, B. ; FISCHER, N. ; GOLAS, M. M. ; SANDER, B. ; DUBE, P. ; BOEHRINGER, D. ; HARTMUTH, K. ; DECKERT, J. ; HAUER, F. ; WOLF, E. ; UCHTENHAGEN, H. ; URLAUB, H. ; HERZOG, F. ; PETERS, J. M. ; POERSCHKE, D. ; LÜHRMANN, R. ; STARK, H.: GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. In: *Nat. Methods* 5 (2008), S. 53–5.
- [129] EVERBERG, H. ; LEIDING, T. ; SCHIÖTH, A. ; TJERNELD, F. ; GUSTAVSSON, N.: Efficient and non-denaturing membrane solubilization combined with enrichment of membrane protein complexes by detergent/polymer aqueous two-phase partitioning for proteome analysis. In: *J. Chromatogr. A* 1122 (2006), S. 35–46.
- [130] SCHINDLER, J. ; NOTHWANG, H. G.: Aqueous polymer two-phase systems: effective tools for plasma membrane proteomics. In: *Proteomics* 6 (2006), S. 5409–17.
- [131] EVERBERG, H. ; GUSTAVSSON, N. ; TJERNED, F.: Enrichment of membrane proteins by partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems. In: *Methods Mol. Biol.* 424 (2008), S. 403–12.
- [132] SEELERT, H. ; KRAUSE, F.: Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels. In: *Electrophoresis* 29 (2008), S. 2617–36.
- [133] ZISCHKA, H. ; WEBER, G. ; WEBER, P. J. ; POSCH, A. ; BRAUN, R. J. ; BÜHRINGER, D. ; SCHNEIDER, U. ; NISSUM, M. ; MEITINGER, T. ; UEFFING, M. ; ECKERSKORN, C.: Improved proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria by free-flow electrophoresis. In: *Proteomics* 3 (2003), S. 906–16.
- [134] EUBEL, H. ; LEE, C. P. ; KUO, J. ; MEYER, E. H. ; TAYLOR, N. L. ; MILLAR, A. H.: Free-flow electrophoresis for purification of plant mitochondria by surface charge. In: *Plant J.* 52 (2007), S. 583–94.
- [135] ZHANG, X. ; SCALF, M. ; WESTPHALL, M. S. ; SMITH, L. M.: Membrane protein separation and analysis by supercritical fluid chromatography-mass spectrometry. In: *Anal. Chem.* 80 (2008), S. 2590–8.
- [136] HUNTE, C.: Specific protein-lipid interactions in membrane proteins. In: *Biochem. Soc. Trans.* 33 (2005), 938–942.
- [137] BARNARD, T. J. ; WALLY, J. L. ; BUCHANAN, S. K.: Crystallization of integral membrane proteins. In: *Curr. Protoc. Protein. Sci.* Chapter 17 (2007), S. Unit 17 9.
- [138] CAFFREY, M.: Membrane protein crystallization. In: *J. Struct. Biol.* 142 (2003), S. 108–32.
- [139] GARAVITO, R. M. ; PICOT, D. ; LOLL, P. J.: Strategies for crystallizing membrane proteins. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 28 (1996), S. 13–27.
- [140] GUSKOV, Albert ; KERN, Jan ; GABDULKHAKOV, Azat ; BROSER, Matthias ; ZOUNI, Athina ; SAENGER, Wolfram: Cyanobacterial photosystem II at 2.9 Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009), 334–342.
- [141] HUNTE, C. ; MICHEL, H.: Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12 (2002), S. 503–8.
- [142] KÜHLBRANDT, W.: Three-dimensional crystallization of membrane proteins. In: *Q. Rev. Biophys.* 21 (1988), S. 429–77.
- [143] OSTERMEIER, C. ; MICHEL, H.: Crystallization of membrane proteins. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997), S. 697–701.
- [144] PEDERSEN, B. P. ; BUCH-PEDERSEN, M. J. ; MORTH, J. P. ; PALMGREN, M. G. ; NISSEN, P.: Crystal structure of the plasma membrane proton pump. In: *Nature* 450 (2007), S. 1111–4.
- [145] RESSL, Susanne ; SCHELTINGA, Anke C T. ; VONRHEIN, Clemens ; OTT, Vera ; ZIEGLER, Christine: Molecular basis of transport and regulation in the Na⁺-betaine symporter BetP. In: *Nature* 458 (2009), 47–52.
- [146] OSTERMEIER, C. ; IWATA, S. ; LUDWIG, B. ; MICHEL, H.: Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase. In: *Nat. Struct. Biol.* 2 (1995), S. 842–6.
- [147] NOLLERT, P. ; NAVARRO, J. ; LANDAU, E. M.: Crystallization of membrane proteins in cubo. In: *Meth. Enzymol.* 343 (2002), S. 183–99.
- [148] WÖHRI, A. B. ; JOHANSSON, L. C. ; WADSTEN-HINDRICHSEN, P. ; WAHLGREN, W. Y. ; FISCHER, G. ; HORSEFIELD, R. ; KATONA, G. ; NYBLUM, M. ; OBERG, F. ; YOUNG, G. ; COGDELL, R. J. ; FRASER, N. J. ; ENGSTROM, S. ; NEUTZE, R.: A lipidic-sponge phase screen for membrane protein crystallization. In: *Structure* 16 (2008), S. 1003–9.
- [149] WANG, G.: NMR of membrane-associated peptides and proteins. In: *Curr. Protein Pept. Sci.* 9 (2008), S. 50–69.
- [150] FRANZIN, C. M. ; GONG, X. M. ; THAI, K. ; YU, J. ; MARASSI, F. M.: NMR of membrane proteins in micelles and bilayers: the FXYD family proteins. In: *Methods* 41 (2007), S. 398–408.

- [151] SAITO, H. ; NAITO, A.: NMR studies on fully hydrated membrane proteins, with emphasis on bacteriorhodopsin as a typical and prototype membrane protein. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007), S. 3145–61.
- [152] POGET, S. F. ; GIRVIN, M. E.: Solution NMR of membrane proteins in bilayer mimics: small is beautiful, but sometimes bigger is better. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007), S. 3098–106.
- [153] BASTING, D. ; LEHNER, I. ; LORCH, M. ; GLAUBITZ, C.: Investigating transport proteins by solid state NMR. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 372 (2006), S. 451–64.
- [154] BROWN, M. F. ; HEYN, M. P. ; JOB, C. ; KIM, S. ; MOLTKE, S. ; NAKANISHI, K. ; NEVZOROV, A. A. ; STRUTS, A. V. ; SALGADO, G. F. ; WALLAT, I.: Solid-state ^2H NMR spectroscopy of retinal proteins in aligned membranes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007), S. 2979–3000.
- [155] LACAPÈRE, J. J. ; PEBAY-PEYROULA, E. ; NEUMANN, J. M. ; ETCHEBEST, C.: Determining membrane protein structures: still a challenge! In: *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007), S. 259–70.
- [156] TORRES, J. ; STEVENS, T. J. ; SAMSÓ, M.: Membrane proteins: the 'Wild West' of structural biology. In: *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003), S. 137–44.
- [157] CHIU, W. ; BAKER, M. L. ; ALMO, S. C.: Structural biology of cellular machines. In: *Trends Cell Biol.* 16 (2006), S. 144–50.
- [158] FLEISHMAN, S. J. ; UNGER, V. M. ; BEN-TAL, N.: Transmembrane protein structures without X-rays. In: *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006), S. 106–13.
- [159] STAHLBERG, H. ; ENGEL, A. ; PHILIPPSEN, A.: Assessing the structure of membrane proteins: combining different methods gives the full picture. In: *Biochem. Cell Biol.* 80 (2002), S. 563–8.
- [160] WERTEN, P. J. ; RÉMIGY, H. W. ; GROOT, B. L. ; FOTIADIS, D. ; PHILIPPSEN, A. ; STAHLBERG, H. ; GRUBMÜLLER, H. ; ENGEL, A.: Progress in the analysis of membrane protein structure and function. In: *FEBS Lett.* 529 (2002), S. 65–72.
- [161] ATAKA, K. ; HEBERLE, J.: Biochemical applications of surface-enhanced infrared absorption spectroscopy. In: *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007), S. 47–54.
- [162] BARTH, A.: Infrared spectroscopy of proteins. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007), S. 1073–101.
- [163] BRAIMAN, M. S. ; ROTHSCHILD, K. J.: Fourier transform infrared techniques for probing membrane protein structure. In: *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17 (1988), S. 541–70.
- [164] BULHELLER, B. M. ; RODGER, A. ; HIRST, J. D.: Circular and linear dichroism of proteins. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007), S. 2020–35.
- [165] GREENFIELD, N. J.: Circular dichroism analysis for protein-protein interactions. In: *Methods Mol. Biol.* 261 (2004), S. 55–78.
- [166] KELLY, S. M. ; JESS, T. J. ; PRICE, N. C.: How to study proteins by circular dichroism. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1751 (2005), S. 119–39.
- [167] PELTON, J. T. ; MCLEAN, L. R.: Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. In: *Anal. Biochem.* 277 (2000), S. 167–76.
- [168] LOURA, Luís M S ; ALMEIDA, Rodrigo F M. ; SILVA, Liana C. ; PRIETO, Manuel: FRET analysis of domain formation and properties in complex membrane systems. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009), 209–224.
- [169] KERPPOLA, Tom K.: Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. In: *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009), 2876–2886.
- [170] ROYER, C. A.: Fluorescence spectroscopy. In: *Methods Mol. Biol.* 40 (1995), S. 65–89.
- [171] SCHIEMANN, O. ; PRISNER, T. F.: Long-range distance determinations in biomacromolecules by EPR spectroscopy. In: *Q. Rev. Biophys.* 40 (2007), S. 1–53.
- [172] LYUBENOVA, S. ; SIDDIQUI, M. K. ; VRIES, M. J. ; LUDWIG, B. ; PRISNER, T. F.: Protein-protein interactions studied by EPR relaxation measurements: cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase. In: *J. Phys. Chem. B* 111 (2007), S. 3839–46.
- [173] TAMM, L. K. ; LAI, A. L. ; LI, Y.: Combined NMR and EPR spectroscopy to determine structures of viral fusion domains in membranes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007), S. 3052–60.
- [174] SINZ, A.: Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. In: *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006), S. 663–82.
- [175] MORGNER, N. ; KLEINSCHROTH, T. ; BARTH, H. D. ; LUDWIG, B. ; BRUTSCHY, B.: A novel approach to analyze membrane proteins by laser mass spectrometry: from protein subunits to the integral complex. In: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007), S. 1429–38.
- [176] ROSINKE, B. ; STRUPAT, K. ; HILLENKAMP, F. ; ROSENBUSCH, J. ; DENCHER, N. ; KRÜGER, U. ; GALLA, H. J.: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass-spectrometry (MALDI-MS) of membrane-proteins and noncovalent complexes. In: *J. Mass Spectrom.* 30 (1995), 1462–1468.
- [177] SHARON, M. ; ROBINSON, C. V.: The role of mass spectrometry in structure elucidation of dynamic protein complexes. In: *Annu. Rev. Biochem.* 76 (2007), S. 167–93.
- [178] SEELERT, H.: *Reinigung, Kristallisation und Strukturermittlung der CF₀F₁-ATP-Synthase aus Spinacea oleracea L.*, Technische Universität Darmstadt, Dissertation, 2000.
- [179] ARTENI, A. A. ; NOWACZYK, M. ; LAX, J. ; KOUŘIL, R. ; RÖGNER, M. ; BOEKEMA, E. J.: Single particle electron microscopy in combination with mass spectrometry to investigate novel complexes of membrane proteins. In: *J. Struct. Biol.* 149 (2005), S. 325–31.

- [180] LUČIĆ, V. ; FÖRSTER, F. ; BAUMEISTER, W.: Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. In: *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005), S. 833–65.
- [181] CHIU, W. ; MCGOUGH, A. ; SHERMAN, M. B. ; SCHMID, M. F.: High-resolution electron cryomicroscopy of macromolecular assemblies. In: *Trends Cell Biol.* 9 (1999), S. 154–9.
- [182] STEVEN, A. ; BELNAP, D.: Electron microscopy and image processing: an essential tool for structural analysis of macromolecules. In: *Curr. Protoc. Protein. Sci.* Chapter 17 (2005), S. Unit 17 2.
- [183] ZHANG, X. ; SETTEMBRE, E. ; XU, C. ; DORMITZER, P. R. ; BELLAMY, R. ; HARRISON, S. C. ; GRIGORIEFF, N.: Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008), S. 1867–72.
- [184] RENAULT, L. ; CHOU, H. T. ; CHIU, P. L. ; HILL, R. M. ; ZENG, X. ; GIPSON, B. ; ZHANG, Z. Y. ; CHENG, A. ; UNGER, V. ; STAHLBERG, H.: Milestones in electron crystallography. In: *J. Comput. Aided Mol. Des.* 20 (2006), S. 519–27.
- [185] KÜHLBRANDT, W.: Two-dimensional crystallization of membrane proteins. In: *Q. Rev. Biophys.* 25 (1992), S. 1–49.
- [186] LÉVY, D. ; MOSSER, G. ; LAMBERT, O. ; MOECK, G. S. ; BALD, D. ; RIGAUD, J. L.: Two-dimensional crystallization on lipid layer: A successful approach for membrane proteins. In: *J. Struct. Biol.* 127 (1999), S. 44–52.
- [187] LACAPÈRE, J. J. ; STOKES, D. L. ; MOSSER, G. ; RANCK, J. L. ; LEBLANC, G. ; RIGAUD, J. L.: Two-dimensional crystal formation from solubilized membrane proteins using Bio-Beads to remove detergent. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 834 (1997), S. 9–18.
- [188] RÉMIGY, H. W. ; CAUJOLLE-BERT, D. ; SUDA, K. ; SCHENK, A. ; CHAMI, M. ; ENGEL, A.: Membrane protein reconstitution and crystallization by controlled dilution. In: *FEBS Lett.* 555 (2003), S. 160–9.
- [189] BINNIG, G. ; QUATE, C. F. ; GERBER, Ch.: Atomic Force Microscope. In: *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986), S. 930–933.
- [190] SILVA, L. P.: Imaging proteins with atomic force microscopy: an overview. In: *Curr. Protein Pept. Sci.* 6 (2005), S. 387–95.
- [191] MÜLLER, D. J. ; ENGEL, A.: Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins. In: *Nat. Protoc.* 2 (2007), S. 2191–7.
- [192] ENGEL, A. ; GAUB, H. E.: Structure and mechanics of membrane proteins. In: *Annu. Rev. Biochem.* 77 (2008), S. 127–48.
- [193] MÜLLER, D. J.: AFM: a nanotool in membrane biology. In: *Biochemistry* 47 (2008), S. 7986–98.
- [194] PAROT, P. ; DUFRÈNE, Y. F. ; HINTERDORFER, P. ; LE GRIMELLE, C. ; NAVAJAS, D. ; PELLEQUER, J. L. ; SCHEURING, S.: Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. In: *J. Mol. Recognit.* 20 (2007), S. 418–31.
- [195] DUFRÈNE, Yves E.: Towards nanomicrobiology using atomic force microscopy. In: *Nat Rev Microbiol* 6 (2008), 674–680.
- [196] KEDROV, A. ; JANOVJAK, H. ; SAPRA, K. T. ; MÜLLER, D. J.: Deciphering molecular interactions of native membrane proteins by single-molecule force spectroscopy. In: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36 (2007), S. 233–60.
- [197] NEFF, D. ; TRIPATHI, S. ; MIDDENDORF, K. ; STAHLBERG, H. ; BUTT, H. J. ; BAMBERG, E. ; DENCHER, N. A.: Chloroplast F₀F₁ ATP synthase imaged by atomic force microscopy. In: *J. Struct. Biol.* 119 (1997), S. 139–48.
- [198] SEELERT, H. ; DANI, D. N. ; DANTE, S. ; HAUSS, T. ; KRAUSE, F. ; SCHÄFER, E. ; FRENZEL, M. ; POETSCH, A. ; REXROTH, S. ; SCHWASSMANN, H. J. ; SUHAI, T. ; VONCK, J. ; DENCHER, N. A.: From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009), 657–671.
- [199] RADERMACHER, M. ; RUIZ, T. ; CLASON, T. ; BENJAMIN, S. ; BRANDT, U. ; ZICKERMANN, V.: The three-dimensional structure of complex I from *Yarrowia lipolytica*: a highly dynamic enzyme. In: *J. Struct. Biol.* 154 (2006), S. 269–79.
- [200] EFREMOV, Rouslan G. ; BARADARAN, Rozbeh ; SAZANOV, Leonid A.: The architecture of respiratory complex I. In: *Nature* 465 (2010), 441–445.
- [201] FISKE, C. H. ; SUBBAROW, Y.: Phosphorus Compounds of Muscle and Liver. In: *Science* 70 (1929), S. 381–382.
- [202] LOHMANN, K.: Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. In: *Naturwissenschaften* 17 (1929), 624–625.
- [203] LANGEN, Peter ; HUCHO, Ferdinand: Karl Lohmann und die Entdeckung des ATP. In: *Angew. Chem.* 120 (2008), 1848–1851.
- [204] LIPMANN, Fritz: Metabolic Generation and Utilization of Phosphate Bond Energy. In: F. F. NORD, C.H. W. (Hrsg.): *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* Bd. 1. Interscience Publishers, Inc. (Wiley), 1941, S. 99–162.
- [205] BADDILEY, J. ; TODD, A. R.: Nucleotides. Part I. Muscle adenylic acid and adenosine diphosphate. In: *J. Chem. Soc.* 122 (1947), S. 648 – 651.
- [206] BADDILEY, J. ; MICHELSON, A. M. ; TODD, A. R.: Nucleotides. Part II. A synthesis of adenosine triphosphate. In: *J. Chem. Soc.* 124 (1949), S. 582 – 586.
- [207] KENAN, Daniel J. ; WAHL, Miriam L.: Ectopic localization of mitochondrial ATP synthase: a target for anti-angiogenesis intervention? In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 37 (2005), 461–465.
- [208] FERNÁNDEZ-MORÁN, H.: Cell-membrane ultrastructure. Low-temperature electron microscopy and x-ray diffraction studies of lipoprotein components in lamellar systems. In: *Circulation* 26 (1962), S. 1039–65.
- [209] RACKER, E. ; HORSTMAN, L. L.: Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. 13. Structure and function of submitochondrial particles completely resolved with respect to coupling factor. In: *J. Biol. Chem.* 242 (1967), S. 2547–2551.
- [210] AVRON, Mordhay: A coupling factor in photophosphorylation. In: *Biochim. Biophys. Acta* 77 (1963), 699–702.

- [211] McCARTY, R. E.: A plant biochemist's view of H⁺ ATPases and ATP synthases. In: *J. Exp. Biol.* 172 (1992), S. 431–441.
- [212] GROTH, G.: Structure of spinach chloroplast F₁-ATPase complexed with the phytopathogenic inhibitor tentoxin. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002), S. 3464–8.
- [213] GROTH, G. ; POHL, E.: The structure of the chloroplast F₁-ATPase at 3.2 Å resolution. In: *J. Biol. Chem.* 276 (2001), S. 1345–52.
- [214] ABRAHAM, J. P. ; LESLIE, A. G. ; LUTTER, R. ; WALKER, J. E.: Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. In: *Nature* 370 (1994), S. 621–8.
- [215] DICKSON, V. K. ; SILVESTER, J. A. ; FEARNLEY, I. M. ; LESLIE, A. G. ; WALKER, J. E.: On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. In: *EMBO J.* 25 (2006), S. 2911–8.
- [216] REES, David M. ; LESLIE, Andrew G. W. ; WALKER, John E.: The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009), 21597–21601.
- [217] WALKER, J. E. ; DICKSON, V. K.: The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. In: *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1757 (2006), 286–296.
- [218] LAU, Wilson C. Y. ; BAKER, Lindsay A. ; RUBINSTEIN, John L.: Cryo-EM structure of the yeast ATP synthase. In: *J. Mol. Biol.* 382 (2008), 1256–1264.
- [219] REXROTH, S. ; TITTINGDORF, J. M. Z. ; SCHWASSMANN, H. J. ; KRAUSE, F. ; SEELERT, H. ; DENCHER, N. A.: Dimeric H⁺-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1658 (2004), S. 202–11.
- [220] SEELERT, H. ; POETSCH, A. ; DENCHER, N. A. ; ENGEL, A. ; STAHLBERG, H. ; MÜLLER, D. J.: Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. In: *Nature* 405 (2000), S. 418–9.
- [221] BOYER, P. D.: Energy, life, and ATP. In: *Biosci. Rep.* 18 (1998), S. 97–117.
- [222] YOSHIDA, M. ; MUNUYUKI, E. ; HISABORI, T.: ATP synthase—a marvellous rotary engine of the cell. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001), S. 669–77.
- [223] RACKER, E.: A mitochondrial factor conferring oligomycin sensitivity on soluble mitochondrial ATPase. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10 (1963), S. 435–439.
- [224] FOLCH, J. ; LEES, M.: Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. In: *J. Biol. Chem.* 191 (1951), S. 807–817.
- [225] POGORYELOV, D. ; NIKOLAEV, Y. ; SCHLATTNER, U. ; PERVUSHIN, K. ; DIMROTH, P. ; MEIER, T.: Probing the rotor subunit interface of the ATP synthase from *Ilyobacter tartaricus*. In: *FEBS J.* 275 (2008), S. 4850–62.
- [226] UENO, Hiroshi ; SUZUKI, Toshiharu ; KINOSITA, Kazuhiko ; YOSHIDA, Masasuke: ATP-driven stepwise rotation of F₁F₀-ATP synthase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005), 1333–1338.
- [227] DÜSER, Monika G. ; ZARRABI, Nawid ; CIPRIANO, Daniel J. ; ERNST, Stefan ; GLICK, Gary D. ; DUNN, Stanley D. ; BÖRSCH, Michael: 36 degrees step size of proton-driven c-ring rotation in F₁F₀-ATP synthase. In: *EMBO J.* 28 (2009), 2689–2696.
- [228] McCARTY, R.E. ; RACKER, E.: Partial Resolution Of Enzymes Catalyzing Photophosphorylation .2. Inhibition And Stimulation of Photophosphorylation By N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide. In: *J. Biol. Chem.* 242 (1967), S. 3435–3439.
- [229] STEKHOVEN, F. S. ; WAITKUS, R. F. ; VAN MOERKERK, H. T.: Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-binding protein in the oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase from bovine heart mitochondria. In: *Biochemistry* 11 (1972), S. 1144–50.
- [230] NELSON, N. ; EYTAN, E. ; NOTSANI, B. E. ; SIGRIST, H. ; SIGRIST-NELSON, K. ; GITLER, C.: Isolation of a chloroplast N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid, active in proton translocation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (1977), S. 2375–8.
- [231] TANDY, N. E. ; DILLEY, R. A. ; HERMODSON, M. A. ; BHATNAGAR, D.: Evidence for an interaction between protons released in chloroplast photosystem II water oxidation and the 8000 Mr hydrophobic subunit of the energy-coupling complex. In: *J. Biol. Chem.* 257 (1982), S. 4301–7.
- [232] ENGELBRECHT, S. ; JUNGE, W.: ATP synthase: a tentative structural model. In: *FEBS Lett.* 414 (1997), S. 485–491.
- [233] JUNGE, W. ; LILL, H. ; ENGELBRECHT, S.: ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. In: *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997), S. 420–3.
- [234] VIK, S. B. ; ANTONIO, B. J.: A mechanism of proton translocation by F₁F₀ ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit. In: *J. Biol. Chem.* 269 (1994), S. 30364–9.
- [235] DUNCAN, T. M. ; BULYGIN, V. V. ; ZHOU, Y. ; HUTCHEON, M. L. ; CROSS, R. L.: Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F₁-ATPase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995), S. 10964–8.
- [236] STEED, P. R. ; FILLINGAME, Robert H.: Aqueous accessibility to the transmembrane regions of subunit c of the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. In: *J. Biol. Chem.* 284 (2009), 23243–23250.
- [237] STEED, P. R. ; FILLINGAME, R. H.: Subunit a facilitates aqueous access to a membrane-embedded region of subunit c in *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. In: *J. Biol. Chem.* 283 (2008), S. 12365–72.
- [238] JUNGE, Wolfgang ; SIELAFF, Hendrik ; ENGELBRECHT, Siegfried: Torque generation and elastic power transmission in the rotary F₀F₁-ATPase. In: *Nature* 459 (2009), 364–370.
- [239] HINKLE, P. C.: P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. In: *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1706 (2005), 1–11.

- [240] MITCHELL, P ; MOYLE, J.: Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria. In: *Nature* 208 (1965), S. 147–151.
- [241] TOMASHEK, J. J. ; BRUSILOV, W. S.: Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 32 (2000), S. 493–500.
- [242] STOCK, D. ; LESLIE, A. G. ; WALKER, J. E.: Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. In: *Science* 286 (1999), S. 1700–5.
- [243] JONES, P. C. ; FILLINGAME, R. H.: Genetic fusions of subunit c in the F_0 sector of H^+ -transporting ATP synthase. Functional dimers and trimers and determination of stoichiometry by cross-linking analysis. In: *J. Biol. Chem.* 273 (1998), S. 29701–5.
- [244] FERGUSON, S. J.: ATP synthase: what dictates the size of a ring? In: *Curr. Biol.* 10 (2000), S. 804–808.
- [245] LOKKEMA, J. S. ; BOEKEMA, E. J.: The A-type ATP synthase subunit K of *Methanopyrus kandleri* is deduced from its sequence to form a monomeric rotor comprising 13 hairpin domains. In: *FEBS Lett.* 543 (2003), S. 47–50.
- [246] SUZUKI, T. ; OZAKI, Y. ; SONE, N. ; FENIOUK, B. A. ; YOSHIDA, M.: The product of *uncI* gene in F_1F_0 -ATP synthase operon plays a chaperone-like role to assist c-ring assembly. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007), S. 20776–81.
- [247] OZAKI, Y. ; SUZUKI, T. ; KURUMA, Y. ; UEDA, T. ; YOSHIDA, M.: UncI protein can mediate ring-assembly of c-subunits of F_0F_1 -ATP synthase in vitro. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367 (2008), S. 663–6.
- [248] ARECHAGA, I. ; BUTLER, P. J. ; WALKER, J. E.: Self-assembly of ATP synthase subunit c rings. In: *FEBS Lett.* 515 (2002), S. 189–93.
- [249] SCHEMIDT, R. A. ; HSU, D. K. ; DECKERS-HEBESTREIT, G. ; ALTENDORF, K. ; BRUSILOV, W. S.: The effects of an atpE ribosome-binding site mutation on the stoichiometry of the c subunit in the F_1F_0 ATPase of *Escherichia coli*. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 323 (1995), S. 423–8.
- [250] SCHEMIDT, R. A. ; QU, J. ; WILLIAMS, J. R. ; BRUSILOV, W. S.: Effects of carbon source on expression of F_0 genes and on the stoichiometry of the c subunit in the F_1F_0 ATPase of *Escherichia coli*. In: *J. Bacteriol.* 180 (1998), S. 3205–8.
- [251] KUCHARCZYK, Roza ; ZICK, Michael ; BIETENHADER, Maïlis ; RAK, Malgorzata ; COUPLAN, Elodie ; BLONDEL, Marc ; CAUBET, Stéphane-Duvezin ; RAGO, Jean-Paul di: Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009), 186–199.
- [252] HALTIA, Matti: The neuronal ceroid-lipofuscinoses: from past to present. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1762 (2006), 850–856.
- [253] JOLLY, R. D. ; BROWN, S. ; DAS, A. M. ; WALKLEY, S. U.: Mitochondrial dysfunction in the neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). In: *Neurochem. Int.* 40 (2002), S. 565–571.
- [254] JALANKO, Anu ; BRAULKE, Thomas: Neuronal ceroid lipofuscinoses. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009), 697–709.
- [255] FEARNLEY, I. M. ; WALKER, J. E. ; MARTINUS, R. D. ; JOLLY, R. D. ; KIRKLAND, K. B. ; SHAW, G. J. ; PALMER, D. N.: The sequence of the major protein stored in ovine ceroid lipofuscinosis is identical with that of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive proteolipid of mitochondrial ATP synthase. In: *Biochem. J.* 268 (1990), S. 751–758.
- [256] CHEN, R. M. ; FEARNLEY, I. M. ; PALMER, D. N. ; WALKER, J. E.: Lysine 43 is trimethylated in subunit c from bovine mitochondrial ATP synthase and in storage bodies associated with Batten disease. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2004), 21883–21887.
- [257] MAEDA, M.: ATP synthases: bioinformatic based insights into how their electrochemically driven motor comprised of subunits a and c might serve as a drug target. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 40 (2008), S. 117–21.
- [258] ANDRIES, K. ; VERHASSELT, P. ; GUILLEMONT, J. ; GOHLMANN, H. W. H. ; NEEFS, J. M. ; WINKLER, H. ; VAN GESTEL, J. ; TIMMERMAN, P. ; ZHU, M. ; LEE, E. ; WILLIAMS, P. ; CHAFFOY, D. de ; HUITRIC, E. ; HOFFNER, S. ; CAMBAU, E. ; TRUFFOT-PERNOT, C. ; LOUNIS, N. ; JARLIER, V.: A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Science* 307 (2005), 223–227.
- [259] KOUL, Anil ; DENDOUGA, Najoua ; VERGAUWEN, Karen ; MOLENBERGHS, Brenda ; VRANCKX, Luc ; WILLEBRORDS, Rudy ; RISTIC, Zorica ; LILL, Holger ; DORANGE, Ismet ; GUILLEMONT, Jerome ; BALD, Dirk ; ANDRIES, Koen: Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. In: *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007), 323–324.
- [260] KOUL, Anil ; VRANCKX, Luc ; DENDOUGA, Najoua ; BALEMANS, Wendy ; WYNGAERT, Ilse V. ; VERGAUWEN, Karen ; GÖHLMANN, Hinrich W. H. ; WILLEBRORDS, Rudy ; PONCELET, Alain ; GUILLEMONT, Jerome ; BALD, Dirk ; ANDRIES, Koen: Diarylquinolines are bactericidal for dormant mycobacteria as a result of disturbed ATP homeostasis. In: *J. Biol. Chem.* 283 (2008), 25273–25280.
- [261] DIACON, Andreas H. ; PYM, Alexander ; GROBUSCH, Martin ; PATIENTIA, Ramonde ; RUSTOMJEE, Roxana ; PAGE-SHIPP, Liesl ; PISTORIUS, Christoffel ; KRAUSE, Rene ; BOGOSHI, Mampedi ; CHURCHYARD, Gavin ; VENTER, Amour ; ALLEN, Jenny ; PALOMINO, Juan C. ; MAREZ, Tine D. ; HEESWIJK, Rolf P. G. ; LOUNIS, Nacer ; MEYVISCH, Paul ; VERBEECK, Johan ; PARYS, Wim ; BEULE, Karel de ; ANDRIES, Koen ; NEELEY, David F. M.: The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. In: *N. Engl. J. Med.* 360 (2009), 2397–2405.
- [262] FENIOUK, B. A. ; YOSHIDA, M.: Regulatory mechanisms of proton-translocating F_0F_1 -ATP synthase. In: *Results Probl. Cell Differ.* 45 (2008), S. 279–308.
- [263] GAO, Yi Q. ; YANG, Wei ; KARPLUS, Martin: A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F_1 -ATPase. In: *Cell* 123 (2005), 195–205.

- [264] IIZUKA, S. ; KATO, S. ; YOSHIDA, M. ; KATO-YAMADA, Y.: γ - ϵ sub-complex of thermophilic ATP synthase has the ability to bind ATP. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349 (2006), 1368-1371.
- [265] NELSON, N. ; NELSON, H. ; RACKER, E.: Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XII. Purification and properties of an inhibitor isolated from chloroplast coupling factor 1. In: *J. Biol. Chem.* 247 (1972), S. 7657-7662.
- [266] RICHTER, M. L. ; PATRIE, W. J. ; MCCARTY, R. E.: Preparation of the ϵ subunit and ϵ subunit-deficient chloroplast coupling factor 1 in reconstitutively active forms. In: *J. Biol. Chem.* 259 (1984), S. 7371-3.
- [267] WILKENS, S. ; DAHLQUIST, F. W. ; MCINTOSH, L. P. ; DONALDSON, L. W. ; CAPALDI, R. A.: Structural features of the ϵ subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase determined by NMR spectroscopy. In: *Nat. Struct. Biol.* 2 (1995), S. 961-7.
- [268] UHLIN, U. ; COX, G. B. ; GUSS, J. M.: Crystal structure of the ϵ subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. In: *Structure* 5 (1997), S. 1219-30.
- [269] RODGERS, A. J. ; WILCE, M. C.: Structure of the γ - ϵ complex of ATP synthase. In: *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000), S. 1051-4.
- [270] SUZUKI, T. ; MURAKAMI, T. ; IINO, R. ; SUZUKI, J. ; ONO, S. ; SHIRAKIHARA, Y. ; YOSHIDA, M.: F_0F_1 -ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of ϵ subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance. In: *J. Biol. Chem.* 278 (2003), S. 46840-6.
- [271] RICHTER, M. L. ; MCCARTY, R. E.: Energy-dependent changes in the conformation of the ϵ subunit of the chloroplast ATP synthase. In: *J. Biol. Chem.* 262 (1987), S. 15037-40.
- [272] MCCARTY, R. E.: ATP synthase of chloroplast thylakoid membranes: a more in depth characterization of its ATPase activity. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 37 (2005), S. 289-99.
- [273] AVRON, M.: Light-dependent adenosine triphosphatase in chloroplasts. In: *J. Biol. Chem.* 237 (1962), S. 2011-7.
- [274] ARANA, J. L. ; VALLEJOS, R. H.: Involvement of sulfhydryl groups in the activation mechanism of the ATPase activity of chloroplast coupling factor 1. In: *J. Biol. Chem.* 257 (1982), 1125-1127.
- [275] NALIN, C. M. ; MCCARTY, R. E.: Role of a disulfide bond in the gamma subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1. In: *J. Biol. Chem.* 259 (1984), S. 7275-80.
- [276] SAMRA, Hardeep S. ; GAO, Fei ; HE, Feng ; HOANG, Etter ; CHEN, Zugen ; GEGENHEIMER, Peter A. ; BERRIE, Cindy L. ; RICHTER, Mark L.: Structural analysis of the regulatory dithiol-containing domain of the chloroplast ATP synthase gamma subunit. In: *J. Biol. Chem.* 281 (2006), 31041-31049.
- [277] RICHTER, M. L. ; SNYDER, B. ; MCCARTY, R. E. ; HAMMES, G. G.: Binding stoichiometry and structural mapping of the ϵ polypeptide of chloroplast coupling factor 1. In: *Biochemistry* 24 (1985), S. 5755-63.
- [278] RICHTER, M. L.: γ - ϵ Interactions Regulate the Chloroplast ATP Synthase. In: *Photosynth. Res.* 79 (2004), S. 319-29.
- [279] BAKELS, R.H.A. ; WALRAVEN, H.S. van ; SCHOLTS, M.J.C. ; KRAB, K. ; KRAAYENHOF, R.: Activation of the H^+ -ATP synthases of a thermophilic cyanobacterium and chloroplasts - a comparative study. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1058 (1991), S. 225-234.
- [280] WALRAVEN, H.S. van ; BAKELS, R.H.A.: Function, structure and regulation of cyanobacterial and chloroplast ATP synthase. In: *Physiol. Plant.* 96 (1996), S. 526-532.
- [281] WILKENS, S. ; CAPALDI, R. A.: ATP synthase's second stalk comes into focus. In: *Nature* 393 (1998), S. 29.
- [282] OGILVIE, I. ; WILKENS, S. ; RODGERS, A. J. ; AGGELER, R. ; CAPALDI, R. A.: The second stalk: the δ -b subunit connection in ECF_1F_0 . In: *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643 (1998), S. 169-75.
- [283] WEBER, J.: ATP synthase-the structure of the stator stalk. In: *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007), S. 53-6.
- [284] CLAGGETT, Shane B. ; PLANCHER, Mac O. ; DUNN, Stanley D. ; CAIN, Brian D.: The b subunits in the peripheral stalk of F_1F_0 ATP synthase preferentially adopt an offset relationship. In: *J. Biol. Chem.* 284 (2009), 16531-16540.
- [285] BHATT, Deepa ; COLE, Stephanie P. ; GRABAR, Tammy B. ; CLAGGETT, Shane B. ; CAIN, Brian D.: Manipulating the length of the b subunit F_1 binding domain in F_1F_0 ATP synthase from *Escherichia coli*. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 37 (2005), 67-74.
- [286] SOUBANNIER, Vincent ; VAILLIER, Jacques ; PAUMARD, Patrick ; COULARY, Benedicte ; SCHAEFFER, Jacques ; VELOURS, Jean: In the absence of the first membrane-spanning segment of subunit 4(b), the yeast ATP synthase is functional but does not dimerize or oligomerize. In: *J. Biol. Chem.* 277 (2002), 10739-10745.
- [287] ALLEN, R. D.: Membrane Tubulation and Proton Pumps. In: *Protoplasma* 189 (1995), 1-8.
- [288] ARNOLD, I. ; PFEIFFER, K. ; NEUPERT, W. ; STUART, R. A. ; SCHÄGGER, H.: Yeast mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. In: *EMBO J.* 17 (1998), 7170-8.
- [289] PAUMARD, P. ; VAILLIER, J. ; COULARY, B. ; SCHAEFFER, J. ; SOUBANNIER, V. ; MUELLER, D. M. ; BRÈTHES, D. ; RAGO, J. P. ; VELOURS, J.: The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. In: *EMBO J.* 21 (2002), S. 221-30.
- [290] KRAUSE, F. ; REIFSCHNEIDER, N. H. ; GOTO, S. ; DENCHER, N. A.: Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329 (2005), S. 583-90.
- [291] WITTIG, I. ; SCHÄGGER, H.: Advantages and limitations of clear-native PAGE. In: *Proteomics* 5 (2005), S. 4338-46.
- [292] FRENZEL, Monika ; ROMMELSPACHER, Hans ; SUGAWA, Michiru D. ; DENCHER, Norbert A.: Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex. In: *Exp Gerontol* 45 (2010), 563-572.
- [293] CABEZÓN, E. ; ARECHAGA, I. ; JONATHAN, P. ; BUTLER, G. ; WALKER, J. E.: Dimerization of bovine F_1 -ATPase by binding the inhibitor protein, IF_1 . In: *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 28353-28355.

- [294] CAMPANELLA, Michelangelo ; PARKER, Nadeene ; TAN, Choon H. ; HALL, Andrew M. ; DUCHEN, Michael R.: IF₁: setting the pace of the F₁F₀-ATP synthase. In: *Trends Biochem. Sci.* 34 (2009), 343–350.
- [295] CABEZÓN, Elena ; MONTGOMERY, Martin G. ; LESLIE, Andrew G W. ; WALKER, John E.: The structure of bovine F₁-ATPase in complex with its regulatory protein IF₁. In: *Nat Struct Biol* 10 (2003), 744–750.
- [296] GLEDHILL, Jonathan R. ; MONTGOMERY, Martin G. ; LESLIE, Andrew G W. ; WALKER, John E.: How the regulatory protein, IF₁, inhibits F₁-ATPase from bovine mitochondria. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007), 15671–15676.
- [297] CAMPANELLA, Michelangelo ; SERAPHIM, Andreas ; ABETI, Rosella ; CASSWELL, Edward ; ECHAVE, Pedro ; DUCHEN, Michael R.: IF₁, the endogenous regulator of the F₁F₀-ATP synthase, defines mitochondrial volume fraction in HeLa cells by regulating autophagy. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009), 393–401.
- [298] GARCÍA, J. J. ; MORALES-RÍOS, E. ; CORTÉS-HERNÁNDEZ, P. ; RODRÍGUEZ-ZAVALA, J. S.: The inhibitor protein (IF₁) promotes dimerization of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase. In: *Biochemistry* 45 (2006), S. 12695–703.
- [299] DIENHART, M. ; PFEIFFER, K. ; SCHÄGGER, H. ; STUART, R. A.: Formation of the yeast F₁F₀-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. In: *J. Biol. Chem.* 277 (2002), S. 39289–95.
- [300] TOMASETIG, L. ; DI PANCRAZIO, F. ; HARRIS, D. A. ; MAVELLI, I. ; LIPPE, G.: Dimerization of F₀F₁ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF₁. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1556 (2002), S. 133–41.
- [301] GAVIN, Paul D. ; PRESCOTT, Mark ; DEVENISH, Rodney J.: F₁F₀-ATP synthase complex interactions in vivo can occur in the absence of the dimer specific subunit e. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 37 (2005), 55–66.
- [302] WAGNER, Karina ; REHLING, Peter ; SZKLARZ, Luiza K S. ; TAYLOR, Rebecca D. ; PFANNER, Nikolaus ; LAAN, Martin van d.: Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase: the small subunits e and g associate with monomeric complexes to trigger dimerization. In: *J. Mol. Biol.* 392 (2009), 855–861.
- [303] BUELER, S. A. ; RUBINSTEIN, J. L.: Location of subunit d in the peripheral stalk of the ATP synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biochemistry* 47 (2008), S. 11804–10.
- [304] FRONZES, R. ; WEIMANN, T. ; VAILLIER, J. ; VELOURS, J. ; BRÈTHES, D.: The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits. In: *Biochemistry* 45 (2006), S. 6715–23.
- [305] WEIMANN, T. ; VAILLIER, J. ; SALIN, B. ; VELOURS, J.: The intermembrane space loop of subunit b (4) is a major determinant of the stability of yeast oligomeric ATP synthases. In: *Biochemistry* 47 (2008), S. 3556–63.
- [306] ZIMMERBERG, Joshua ; KOZLOV, Michael M.: How proteins produce cellular membrane curvature. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006), 9–19.
- [307] GIRAUD, M. F. ; PAUMARD, P. ; SOUBANNIER, V. ; VAILLIER, J. ; ARSELIN, G. ; SALIN, B. ; SCHAEFFER, J. ; BRÈTHES, D. ; RAGO, J. P. ; VELOURS, J.: Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? In: *Biochim. Biophys. Acta* 1555 (2002), S. 174–80.
- [308] ARSELIN, Geneviève ; VAILLIER, Jacques ; SALIN, Bénédicte ; SCHAEFFER, Jacques ; GIRAUD, Marie-France ; DAUTANT, Alain ; BRÈTHES, Daniel ; VELOURS, Jean: The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2004), 40392–40399.
- [309] GAVIN, P. D. ; PRESCOTT, M. ; LUFF, S. E. ; DEVENISH, R. J.: Cross-linking ATP synthase complexes in vivo eliminates mitochondrial cristae. In: *J. Cell. Sci.* 117 (2004), S. 2333–43.
- [310] RABL, Regina ; SOUBANNIER, Vincent ; SCHOLZ, Roland ; VOGEL, Frank ; MENDL, Nadine ; VASILJEV-NEUMEYER, Andreja ; KÖRNER, Christian ; JAGASIA, Ravi ; KEIL, Thomas ; BAUMEISTER, Wolfgang ; CYRKLAFF, Marek ; NEUPERT, Walter ; REICHERT, Andreas S.: Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fc11 and Su e/g. In: *J. Cell Biol.* 185 (2009), 1047–1063.
- [311] JOHN, George B. ; SHANG, Yonglei ; LI, Li ; RENKEN, Christian ; MANNELLA, Carmen A. ; SELKER, Jeanne M L. ; RANGELL, Linda ; BENNETT, Michael J. ; ZHA, Jiping: The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. In: *Mol. Biol. Cell* 16 (2005), 1543–1554.
- [312] SHIBATA, Yoko ; HU, Junjie ; KOZLOV, Michael M. ; RAPOPORT, Tom A.: Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25 (2009), 329–354.
- [313] MERKWIRTH, Carsten ; DARGAZANLI, Sascha ; TATSUTA, Takashi ; GEIMER, Stefan ; LÖWER, Beatrix ; WUNDERLICH, F. T. ; KLEIST-RETZOW, Jürgen-Christoph von ; WAISMAN, Ari ; WESTERMANN, Benedikt ; LANGER, Thomas: Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. In: *Genes Dev.* 22 (2008), 476–488.
- [314] MERKWIRTH, Carsten ; LANGER, Thomas: Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009), 27–32.
- [315] GARCÍA-TREJO, José J. ; MORALES-RÍOS, Edgar: Regulation of the F₁F₀-ATP Synthase Rotary Nanomotor in its Monomeric-Bacterial and Dimeric-Mitochondrial Forms. In: *J Biol Phys* 34 (2008), 197–212.
- [316] FORNELLS, L. A. ; MOTTA, H. G. ; NEHME, J. S. ; MARTINS, O. B. ; SILVA, J. L.: Pressure effects on the interaction between natural inhibitor protein and mitochondrial F₁-ATPase. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 349 (1998), 304–312.
- [317] DI PANCRAZIO, F. ; BISETTO, E. ; ALVERDI, V. ; MAVELLI, I. ; ESPOSITO, G. ; LIPPE, G.: Differential steady-state tyrosine phosphorylation of two oligomeric forms of mitochondrial F₀F₁ ATP synthase: A structural proteomic analysis. In: *Proteomics* 6 (2006), S. 921–6.
- [318] REINDERS, Jörg ; WAGNER, Karina ; ZAHEDI, Rene P. ; STOJANOVSKI, Diana ; EYRICH, Beate ; LAAN, Martin van d. ; REHLING, Peter ; SICKMANN, Albert ; PFANNER, Nikolaus ; MEISINGER, Chris: Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria

- reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase. In: *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007), 1896–1906.
- [319] BORNHÖVD, C. ; VOGEL, F. ; NEUPERT, W. ; REICHERT, A. S.: Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F₁F₀-ATP synthase supracomplexes. In: *J. Biol. Chem.* 281 (2006), S. 13990–8.
- [320] BELOGRUDOV, Grigory I. ; HATEFI, Youssef: Factor B and the mitochondrial ATP synthase complex. In: *J. Biol. Chem.* 277 (2002), 6097–6103.
- [321] LEE, John K. ; BELOGRUDOV, Grigory I. ; STROUD, Robert M.: Crystal structure of bovine mitochondrial factor B at 0.96-Å resolution. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008), 13379–13384.
- [322] BELOGRUDOV, Grigory I.: Recent advances in structure-functional studies of mitochondrial factor B. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (2009), 137–143.
- [323] BELOGRUDOV, Grigory I.: Coupling factor B affects the morphology of mitochondria. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 42 (2010), 29–35.
- [324] HALESTRAP, Andrew P: What is the mitochondrial permeability transition pore? In: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46 (2009), 821–831.
- [325] HALESTRAP, Andrew P ; PASDOIS, Philippe: The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009), 1402–1415.
- [326] AZARASHVILI, Tamara S. ; TYYNELÄ, Jaana ; ODINOKOVA, Irina V. ; GRIGORJEV, Pavel A. ; BAUMANN, Marc ; EVTODIENKO, Yuri V. ; SARIS, Nils-Erik L.: Phosphorylation of a peptide related to subunit c of the F₀F₁-ATPase/ATP synthase and relationship to permeability transition pore opening in mitochondria. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 34 (2002), S. 279–284.
- [327] AZARASHVILI, T. S. ; TYYNELÄ, J. ; BAUMANN, M. ; EVTODIENKO, Y. V. ; SARIS, N. E.: Ca²⁺-modulated phosphorylation of a low-molecular-mass polypeptide in rat liver mitochondria: evidence that it is identical with subunit c of F₀F₁-ATPase. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270 (2000), 741–744.
- [328] KRESTININA, O. V. ; GRACHEV, D. E. ; ODINOKOVA, I. V. ; REISER, G. ; EVTODIENKO, Yu V. ; AZARASHVILI, T. S.: Effect of peripheral benzodiazepine receptor (PBR/TSPO) ligands on opening of Ca²⁺-induced pore and phosphorylation of 3.5-kDa polypeptide in rat brain mitochondria. In: *Biochemistry (Mosc)* 74 (2009), S. 421–429.
- [329] MAZAT, Jean-Pierre ; JEAN-BART, Eric ; RIGOLET, Michel ; GUÉRIN, Bernard: Control of oxidative phosphorylations in yeast mitochondria. Role of the phosphate carrier. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 849 (1986), 7 - 15.
- [330] BOYLE, G. M. ; ROUCOU, X. ; NAGLEY, P. ; DEVENISH, R. J. ; PRESCOTT, M.: Identification of subunit g of yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase, a protein required for maximal activity of cytochrome c oxidase. In: *Eur. J. Biochem.* 262 (1999), S. 315–323.
- [331] VIGNAIS, P. V. ; VIGNAIS, P. M. ; DOUSSIÈRE, J.: Functional relationship between the ADP/ATP-carrier and the F₁-ATPase in mitochondria. In: *Biochim. Biophys. Acta* 376 (1975), S. 219–230.
- [332] FREISLEBEN, H. J. ; ZIMMER, G.: ATP synthase complex from beef heart mitochondria. Separation of protein bands in the region of 28-31 kDa. In: *Eur J Biochem* 160 (1986), S. 155–161.
- [333] KO, Young H. ; DELANNOY, Michael ; HULLIHEN, Joanne ; CHIU, Wah ; PEDERSEN, Peter L.: Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for P_i and ADP/ATP. In: *J. Biol. Chem.* 278 (2003), 12305–12309.
- [334] CHEN, C. ; KO, Y. ; DELANNOY, M. ; LUDTKE, S. J. ; CHIU, W. ; PEDERSEN, P. L.: Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for P_i and ADP/ATP. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2004), S. 31761–8.
- [335] MURRAY, J. ; MARUSICH, M. E. ; CAPALDI, R. A. ; AGGELER, R.: Focused proteomics: monoclonal antibody-based isolation of the oxidative phosphorylation machinery and detection of phosphoproteins using a fluorescent phosphoprotein gel stain. In: *Electrophoresis* 25 (2004), S. 2520–5.
- [336] DETKE, Siegfried ; ELSABROUTY, Rania: Identification of a mitochondrial ATP synthase-adenine nucleotide translocator complex in *Leishmania*. In: *Acta Trop* 105 (2008), 16–20.
- [337] ARDEHALI, Hossein ; CHEN, Zhenhui ; KO, Young ; MEJÍA-ALVAREZ, Rafael ; MARBÁN, Eduardo: Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004), 11880–11885.
- [338] TIMOHINA, Natalia ; GUZUN, Rita ; TEPP, Kersti ; MONGE, Claire ; VARIKMAA, Minna ; VIJA, Heiki ; SIKK, Peeter ; KAAMBRE, Tuuli ; SACKETT, Dan ; SAKS, Valdur: Direct measurement of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells in situ: some evidence for Mitochondrial Interactosome. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (2009), 259–275.
- [339] HEBERLE, J. ; RIESLE, J. ; THIEDEMANN, G. ; OESTERHELT, D. ; DENCHER, N. A.: Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer. In: *Nature* 370 (1994), S. 379–82.
- [340] JEAN-FRANÇOIS, MJB ; HADIKUSUMO, RG ; WATKINS, LC ; LUKINS, HB ; LINNHANE, AW ; MARZUKI, S: Biogenesis Of Mitochondria .64. Correlation Of Defined Lesions In The N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide-Binding Proteolipid With Defects In The Function And Assembly Of Yeast Mitochondrial H⁺-Atpase And Other Respiratory Enzyme Complexes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 852 (1986), S. 133–143.

- [341] SHEN, Hong ; WALTERS, D. E. ; MUELLER, David M.: Introduction of the chloroplast redox regulatory region in the yeast ATP synthase impairs cytochrome c oxidase. In: *J. Biol. Chem.* 283 (2008), 32937–32943.
- [342] SOTO, Ileana C. ; FONTANESI, Flavia ; VALLEDOR, Melvys ; HORN, Darryl ; SINGH, Rajiv ; BARRIENTOS, Antoni: Synthesis of cytochrome c oxidase subunit 1 is translationally downregulated in the absence of functional F₁F₀-ATP synthase. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009), 1776–1786.
- [343] SADDAR, S. ; DIENHART, M. K. ; STUART, R. A.: The F₁F₀-ATP synthase complex influences the assembly state of the cytochrome bc₁-cytochrome oxidase supercomplex and its association with the TIM23 machinery. In: *J. Biol. Chem.* 283 (2008), S. 6677–86.
- [344] QIU, Z. H. ; YU, L. ; YU, C. A.: Spin-label electron paramagnetic resonance and differential scanning calorimetry studies of the interaction between mitochondrial cytochrome c oxidase and adenosine triphosphate synthase complex. In: *Biochemistry* 31 (1992), S. 3297–3302.
- [345] KRENN, B. E. ; KOPPENAAL, F. ; VAN WALRAVEN, H. S. ; KRAB, K. ; KRAAYENHOF, R.: Co-reconstitution of the H⁺-ATP synthase and cytochrome b-563/c-554 complex from a thermophilic cyanobacterium. High ATP yield and mutual effects on the enzymatic activities. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1140 (1993), 271–281.
- [346] LIU, Xiaoying ; GONG, Xing ; HICKS, David B. ; KRULWICH, Terry A. ; YU, Linda ; YU, Chang-An: Interaction between cytochrome caa₃ and F₁F₀-ATP synthase of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 is demonstrated by saturation transfer electron paramagnetic resonance and differential scanning calorimetry assays. In: *Biochemistry* 46 (2007), 306–313.
- [347] KEILIN, D. ; HARTREE, E. E.: Activity of the cytochrome system in heart muscle preparations. In: *Biochem. J.* 41 (1947), S. 500–2.
- [348] CHANCE, B. ; WILLIAMS, G. R.: A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. In: *Nature* 176 (1955), S. 250–4.
- [349] HATEFI, Y.: The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. In: *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985), S. 1015–69.
- [350] GUPTA, S. ; WU, E. S. ; HOECHLI, L. ; HOECHLI, M. ; JACOBSON, K. ; SOWERS, A. E. ; HACKENBROCK, C. R.: Relationship between lateral diffusion, collision frequency, and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 (1984), 2606–10.
- [351] HACKENBROCK, C. R. ; CHAZOTTE, B. ; GUPTA, S. S.: The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 18 (1986), S. 331–68.
- [352] KRÖGER, A. ; KLINGENBERG, M.: Further evidence for the pool function of ubiquinone as derived from the inhibition of the electron transport by antimycin. In: *Eur. J. Biochem.* 39 (1973), S. 313–323.
- [353] RICH, P. R.: Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 768 (1984), S. 53–79.
- [354] POORE, V. M. ; FITZSIMONS, J. T. ; RAGAN, C. I.: The effects of lipid fluidity on the rotational diffusion of complex I and complex III in reconstituted NADH-cytochrome c oxidoreductase. In: *Biochim. Biophys. Acta* 693 (1982), S. 113–124.
- [355] SCHON, Eric A. ; DENCHER, Norbert A.: Heavy breathing: energy conversion by mitochondrial respiratory supercomplexes. In: *Cell Metab.* 9 (2009), 1–3.
- [356] BOUMANS, H. ; GRIVELL, L. A. ; BERDEN, J. A.: The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. In: *J. Biol. Chem.* 273 (1998), S. 4872–4877.
- [357] HATEFI, Y. ; HAAVIK, A. G. ; GRIFFITHS, D. E.: Reconstitution of the electron transport system. I. Preparation and properties of the interacting enzyme complexes. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4 (1961), S. 441–6.
- [358] HATEFI, Y. ; HAAVIK, A. G. ; FOWLER, L. R. ; GRIFFITHS, D. E.: Studies on the electron transfer system. XLII. Reconstitution of the electron transfer system. In: *J. Biol. Chem.* 237 (1962), S. 2661–9.
- [359] HERON, C. ; RAGAN, C. I. ; TRUMPOWER, B. L.: The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. Restoration of ubiquinone-pool behaviour. In: *Biochem. J.* 174 (1978), S. 791–800.
- [360] RAGAN, C. I. ; HERON, C.: The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. Evidence for stoichiometric association. In: *Biochem. J.* 174 (1978), S. 783–790.
- [361] BERRY, E. A. ; TRUMPOWER, B. L.: Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc₁ and cytochrome c-aa₃ complexes. In: *J. Biol. Chem.* 260 (1985), S. 2458–2467.
- [362] SONE, N. ; SEKIMACHI, M. ; KUTOH, E.: Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed of a bc₁ complex and cytochrome oxidase in the thermophilic bacterium PS3. In: *J. Biol. Chem.* 262 (1987), S. 15386–15391.
- [363] IWASAKI, T. ; MATSUURA, K. ; OSHIMA, T.: Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. I. The archaeal terminal oxidase supercomplex is a functional fusion of respiratory complexes III and IV with no c-type cytochromes. In: *J. Biol. Chem.* 270 (1995), S. 30881–30892.
- [364] BRUEL, C. ; BRASSEUR, R. ; TRUMPOWER, B. L.: Subunit 8 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc₁ complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 28 (1996), S. 59–68.
- [365] SCHÄGGER, H. ; JAGOW, G. von: Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. In: *Anal. Biochem.* 199 (1991), S. 223–31.
- [366] MANCHENKO, Gennady : *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*. second edition. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. : CRC Press, 2003.

- [367] SCHÄGGER, H. ; PFEIFFER, K.: The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. In: *J. Biol. Chem.* 276 (2001), S. 37861–7.
- [368] SCHÄGGER, H. ; PFEIFFER, K.: Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. In: *EMBO J.* 19 (2000), S. 1777–83.
- [369] CRUCIAT, C. M. ; BRUNNER, S. ; BAUMANN, F. ; NEUPERT, W. ; STUART, R. A.: The cytochrome bc₁ and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. In: *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 18093–18098.
- [370] WITTIG, I. ; CARROZZO, R. ; SANTORELLI, F. M. ; SCHÄGGER, H.: Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006), S. 1066–72.
- [371] WITTIG, Ilka ; SCHÄGGER, Hermann: Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009), 672–680.
- [372] ACÍN-PÉREZ, R. ; BAYONA-BAFALUY, M. P. ; FERNÁNDEZ-SILVA, P. ; MORENO-LOSHUERTOS, R. ; PÉREZ-MARTOS, A. ; BRUNO, C. ; MORAES, C. T. ; ENRÍQUEZ, J. A.: Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. In: *Mol. Cell* 13 (2004), S. 805–15.
- [373] MAAS, Marc F P M. ; KRAUSE, Frank ; DENCHER, Norbert A. ; SAINSAARD-CHANET, Annie: Respiratory complexes III and IV are not essential for the assembly/stability of complex I in fungi. In: *J. Mol. Biol.* 387 (2009), 259–269.
- [374] ROSCA, Mariana G. ; VAZQUEZ, Edwin J. ; KERNER, Janos ; PARLAND, William ; CHANDLER, Margaret P. ; STANLEY, William ; SABBAH, Hani N. ; HOPPEL, Charles L.: Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. In: *Cardiovasc. Res.* 80 (2008), 30–39.
- [375] LENAZ, Giorgio ; GENOVA, Maria L.: Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009), S. 1750–1772.
- [376] OSWALD, C. ; KRAUSE-BUCHHOLZ, U. ; RÖDEL, G.: Knockdown of human COX17 affects assembly and supramolecular organization of cytochrome c oxidase. In: *J. Mol. Biol.* 389 (2009), 470–479.
- [377] ZHANG, M. ; MILEYKOVSKAYA, E. ; DOWHAN, W.: Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for super-complex formation in the inner mitochondrial membrane. In: *J. Biol. Chem.* 277 (2002), S. 43553–6.
- [378] PFEIFFER, K. ; GOHIL, V. ; STUART, R. A. ; HUNTE, C. ; BRANDT, U. ; GREENBERG, M. L. ; SCHÄGGER, H.: Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. In: *J. Biol. Chem.* 278 (2003), S. 52873–80.
- [379] HAINES, T. H. ; DENCHER, N. A.: Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. In: *FEBS Lett.* 528 (2002), S. 35–9.
- [380] WENZ, Tina ; HIELSCHER, Ruth ; HELLWIG, Petra ; SCHÄGGER, Hermann ; RICHERS, Sebastian ; HUNTE, Carola: Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc₁ complex catalysis and supercomplex formation. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009), 609–616.
- [381] JÄNSCH, L. ; KRUFFT, V. ; SCHMITZ, U. K. ; BRAUN, H. P.: New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. In: *Plant J.* 9 (1996), S. 357–68.
- [382] MILLAR, A. H. ; EUBEL, H. ; JÄNSCH, L. ; KRUFFT, V. ; HEAZLEWOOD, J. L. ; BRAUN, H. P.: Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. In: *Plant Mol. Biol.* 56 (2004), S. 77–90.
- [383] POETSCH, A. ; SEELERT, H. ; TITTINGDORF, J. Meyer z. ; DENCHER, N. A.: Detergent effect on anion exchange perfusion chromatography and gel filtration of intact chloroplast H⁺-ATP synthase. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265 (1999), S. 520–4.
- [384] SEELERT, H. ; POETSCH, A. ; ROHLFS, M. ; DENCHER, N. A.: Dye-ligand chromatographic purification of intact multisubunit membrane protein complexes: application to the chloroplast H⁺-F₀F₁-ATP synthase. In: *Biochem. J.* 346 (2000), S. 41–4.
- [385] RIGHETTI, P. G.: Electrophoresis: the march of pennies, the march of dimes. In: *J. Chromatogr. A* 1079 (2005), S. 24–40.
- [386] ORNSTEIN, L.: Disc Electrophoresis - I. Background and Theory. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121 (1964), S. 321–49.
- [387] DAVIS, B. J.: Disc Electrophoresis - II. Method and Application to Human Serum Proteins. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121 (1964), S. 404–27.
- [388] SCHÄGGER, H. ; CRAMER, W. A. ; JAGOW, G. von: Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane-Protein Complexes by 2-Dimensional Native Electrophoresis. In: *Anal. Biochem.* 217 (1994), 220–230.
- [389] WITTIG, I. ; KARAS, M. ; SCHÄGGER, H.: High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. In: *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007), S. 1215–25.
- [390] BASS, W. T. ; BRICKER, T. M.: Dodecyl maltoside-sodium dodecyl sulfate two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of chloroplast thylakoid membrane proteins. In: *Anal. Biochem.* 171 (1988), S. 330–8.
- [391] POETSCH, A. ; NEFF, D. ; SEELERT, H. ; SCHÄGGER, H. ; DENCHER, N. A.: Dye removal, catalytic activity and 2D crystallization of chloroplast H⁺-ATP synthase purified by blue native electrophoresis. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1466 (2000), S. 339–49.
- [392] KRAUSE, F. ; SEELERT, H.: Detection and Analysis of Protein-Protein Interactions of Organellar and Prokaryotic Proteomes by Blue Native and Colorless Native Gel Electrophoresis. In: COLIGAN, John E. (Hrsg.) ; DUNN, Ben M. (Hrsg.) ; SPEICHER, David W. (Hrsg.) ; WINGFIELD, Paul T. (Hrsg.): *Current Protocols in Protein Science* Bd. Supplement 51. John

- Wiley and Sons, Inc., 2008, S. UNIT 14.11: 1–36; republished as UNIT 19.18.
- [393] NEFF, D. ; DENCHER, N. A.: Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast F_0F_1 -ATP synthase, CF_0 and CF_1 by blue native electrophoresis. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259 (1999), S. 569–75.
- [394] ROCHAIX, J. D.: *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. In: *Annu. Rev. Genet.* 29 (1995), S. 209–30.
- [395] VLCEK, D. ; SEVCOVICOVÁ, A. ; SVIEZENÁ, B. ; GÁLOVA, E. ; MIADOKOVÁ, E.: *Chlamydomonas reinhardtii*: a convenient model system for the study of DNA repair in photoautotrophic eukaryotes. In: *Curr. Genet.* 53 (2008), S. 1–22.
- [396] MITTAG, M. ; WAGNER, V.: The circadian clock of the unicellular eukaryotic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Biol. Chem.* 384 (2003), S. 689–95.
- [397] WERNER, R.: *Chlamydomonas reinhardtii* as a unicellular model for circadian rhythm analysis. In: *Chronobiol. Int.* 19 (2002), S. 325–43.
- [398] WITMAN, G. B.: *Chlamydomonas* phototaxis. In: *Trends Cell Biol.* 3 (1993), S. 403–8.
- [399] GROSSMAN, A. R. ; LOHR, M. ; IM, C. S.: *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. In: *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004), S. 119–73.
- [400] NICKELSEN, J. ; KÜCK, U.: The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an experimental system to study chloroplast RNA metabolism. In: *Naturwissenschaften* 87 (2000), S. 97–107.
- [401] MERCHANT, S. S. ; ALLEN, M. D. ; KROPAT, J. ; MOSELEY, J. L. ; LONG, J. C. ; TOTTEY, S. ; TERAUCHI, A. M.: Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (2006), S. 578–94.
- [402] HARRIS, E. H.: *Chlamydomonas* as a Model Organism. In: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 (2001), S. 363–406.
- [403] MERCHANT, Sabeeha S. ; PROCHNIK, Simon E. ; VALLON, Olivier ; HARRIS, Elizabeth H. ; KARPOWICZ, Steven J. ; WITMAN, George B. ; TERRY, Astrid ; SALAMOV, Asaf ; FRITZ-LAYLIN, Lillian K. ; MARÉCHAL-DROUARD, Laurence ; MARSHALL, Wallace F. ; QU, Liang-Hu ; NELSON, David R. ; SANDERFOOT, Anton A. ; SPALDING, Martin H. ; KAPITONOV, Vladimir V. ; REN, Qinghu ; FERRIS, Patrick ; LINDQUIST, Erika ; SHAPIRO, Harris ; LUCAS, Susan M. ; GRIMWOOD, Jane ; SCHMUTZ, Jeremy ; CARDOL, Pierre ; CERUTTI, Heriberto ; CHANFREAU, Guillaume ; CHEN, Chun-Long ; COGNAT, Valérie ; CROFT, Martin T. ; DENT, Rachel ; DUTCHER, Susan ; FERNÁNDEZ, Emilio ; FUKUZAWA, Hideya ; GONZÁLEZ-BALLESTER, David ; GONZÁLEZ-HALPHEN, Diego ; HALLMANN, Armin ; HANIKENNE, Marc ; HIPPLER, Michael ; INWOOD, William ; JABBARI, Kamel ; KALANON, Ming ; KURAS, Richard ; LEFEBVRE, Paul A. ; LEMAIRE, Stéphane D ; LOBANOV, Alexey V. ; LOHR, Martin ; MANUELL, Andrea ; MEIER, Iris ; METS, Laurens ; MITTAG, Maria ; MITTELMEIER, Telsa ; MORONEY, James V. ; MOSELEY, Jeffrey ; NAPOLI, Carolyn ; NEDELCO, Aurora M. ; NIYOGI, Krishna ; NOVOSELOV, Sergey V. ; PAULSEN, Ian T. ; PAZOUR, Greg ; PURTON, Saul ; RAL, Jean-Philippe ; PACHÓN, Diego Mauricio R. ; RIEKHOF, Wayne ; RYMARQUIS, Linda ; SCHRODA, Michael ; STERN, David ; UMEN, James ; WILLOWS, Robert ; WILSON, Nedra ; ZIMMER, Sara L. ; ALLMER, Jens ; BALK, Janneke ; BISOVA, Katerina ; CHEN, Chong-Jian ; ELIAS, Marek ; GENDLER, Karla ; HAUSER, Charles ; LAMB, Mary R. ; LEDFORD, Heidi ; LONG, Joanne C. ; MINAGAWA, Jun ; PAGE, M. D. ; PAN, Junmin ; POOTAKHAM, Wirulda ; ROJE, Sanja ; ROSE, Annkatrin ; STAHLBERG, Eric ; TERAUCHI, Aimee M. ; YANG, Pinfen ; BALL, Steven ; BOWLER, Chris ; DIECKMANN, Carol L. ; GLADYSHEV, Vadim N. ; GREEN, Pamela ; JORGENSEN, Richard ; MAYFIELD, Stephen ; MUELLER-ROEBER, Bernd ; RAJAMANI, Sathish ; SAYRE, Richard T. ; BROKSTEIN, Peter ; DUBCHAK, Inna ; GOODSTEIN, David ; HORNICK, Leila ; HUANG, Y. W. ; JHAVERI, Jinal ; LUO, Yigong ; MARTÍNEZ, Diego ; NGAU, Wing Chi A. ; OTILLAR, Bobby ; POLIAKOV, Alexander ; PORTER, Aaron ; SZAJKOWSKI, Lukasz ; WERNER, Gregory ; ZHOU, Kemin ; GRIGORIEV, Igor V. ; ROKHSAR, Daniel S. ; GROSSMAN, Arthur R.: The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. In: *Science* 318 (2007), 245–250.
- [404] RAMESH, V. M. ; BINGHAM, S. E. ; WEBBER, A. N.: A simple method for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Methods Mol. Biol.* 274 (2004), S. 301–7.
- [405] GRIESBECK, C. ; KOBL, I. ; HEITZER, M.: *Chlamydomonas reinhardtii*: a protein expression system for pharmaceutical and biotechnological proteins. In: *Mol. Biotechnol.* 34 (2006), S. 213–23.
- [406] TITTINGDORF, J.M.W. Meyer z.: *Isolation, Charakterisierung und Kristallisation der Chloroplasten-ATP- Synthase und des Subkomplexes CF_0* , Technische Universität Darmstadt, Dissertation, 2004.
- [407] FIEDLER, H. R. ; SCHMID, R. ; LEU, S. ; SHAVIT, N. ; STROTMANN, H.: Isolation of CF_0CF_1 from *Chlamydomonas reinhardtii* cw15 and the N-terminal amino acid sequences of the CF_0CF_1 subunits. In: *FEBS Lett.* 377 (1995), S. 163–6.
- [408] LEMAIRE, C. ; WOLLMAN, F. A.: The chloroplast ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Characterization of its nine constitutive subunits. In: *J. Biol. Chem.* 264 (1989), S. 10228–34.
- [409] REXROTH, Sascha: *Struktur und Dynamik der Thylakoidmembran*, Technische Universität Darmstadt, Dissertation, 2004.
- [410] SCHÄFER, Eva: *Biochemische und strukturelle Untersuchung von Superkomplexen der Atmungskette und von F_0F_1 -ATP-Synthasen*, Technische Universität Darmstadt, Dissertation, 2006.
- [411] SUEOKA, N.: Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 46 (1960), S. 83–91.
- [412] GORMAN, D. S. ; LEVINE, R. P.: Cytochrome *f* and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54 (1965), S. 1665–9.
- [413] REXROTH, S. ; TITTINGDORF, J. M. W. z. ; KRAUSE, F. ; DENCHER, N. A. ; SEELERT, H.: Thylakoid membrane at altered metabolic state: Challenging the forgotten realms of the proteome. In: *Electrophoresis* 24 (2003), S. 2814–23.

- [414] POETSCH, A.: *Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des membranintegralen Komplexes CF₀ und isolierter Untereinheiten der H⁺-ATP-Synthase aus Chloroplasten*, Technische Universität Darmstadt, Dissertation, 1999.
- [415] TITTINGDORF, J. M. z. ; REXROTH, S. ; SCHÄFER, E. ; SCHLICHTING, R. ; GIERSCH, C. ; DENCHER, N. A. ; SEELERT, H.: The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in *Chlamydomonas reinhardtii* is not affected by the metabolic state. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1659 (2004), S. 92–9.
- [416] WETZEL, C. M. ; McCARTY, R. E.: Aspects of Subunit Interactions in the Chloroplast ATP Synthase (I. Isolation of a Chloroplast CF₁-Subunit III Complex from Spinach Thylakoids). In: *Plant Physiol.* 102 (1993), S. 241–249.
- [417] KRAUSE, F.: Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. In: *Electrophoresis* 27 (2006), S. 2759–2781.
- [418] HEIDRICH, Nicolas G.: *Optimierungen zur Elution der Chloroplasten-F₀F₁-ATP-Synthase aus präparativen, farblos-nativen Polyacrylamidgelen*, Technische Universität Darmstadt, Diplomarbeit, 2007.
- [419] FITTER, J.: Structural and dynamical features contributing to thermostability in α -amylases. In: *Cell Mol. Life Sci.* 62 (2005), S. 1925–37.
- [420] JAENICKE, R.: Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. In: *Eur. J. Biochem.* 202 (1991), S. 715–28.
- [421] LI, W. F. ; ZHOU, X. X. ; LU, P.: Structural features of thermozymes. In: *Biotechnol. Adv.* 23 (2005), S. 271–81.
- [422] RAZVI, A. ; SCHOLTZ, J. M.: Lessons in stability from thermophilic proteins. In: *Protein Sci.* 15 (2006), S. 1569–78.
- [423] ZHOU, X. X. ; WANG, Y. B. ; PAN, Y. J. ; LI, W. F.: Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. In: *Amino Acids* 34 (2008), S. 25–33.
- [424] NAKAMURA, Yasukazu ; KANEKO, Takakazu ; SATO, Shusei ; IKEUCHI, Masahiko ; KATOH, Hiroshi ; SASAMOTO, Shigemi ; WATANABE, Akiko ; IRIGUCHI, Mayumi ; KAWASHIMA, Kumiko ; KIMURA, Takaharu ; KISHIDA, Yoshie ; KIYOKAWA, Chiaki ; KOHARA, Mitsuyo ; MATSUMOTO, Midori ; MATSUNO, Ai ; NAKAZAKI, Naomi ; SHIMPO, Sayaka ; SUGIMOTO, Masako ; TAKEUCHI, Chie ; YAMADA, Manabu ; TABATA, Satoshi: Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. In: *DNA Res.* 9 (2002), S. 123–130.
- [425] JORDAN, P. ; FROMME, P. ; WITT, H. T. ; KLUKAS, O. ; SAENGER, W. ; KRAUSS, N.: Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. In: *Nature* 411 (2001), S. 909–17.
- [426] ZOUNI, A. ; WITT, H. T. ; KERN, J. ; FROMME, P. ; KRAUSS, N. ; SAENGER, W. ; ORTH, P.: Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. In: *Nature* 409 (2001), S. 739–43.
- [427] YAGI, Hiromasa ; KONNO, Hiroki ; MURAKAMI-FUSE, Tomoe ; ISU, Atsuko ; OROGUCHI, Tomotaka ; AKUTSU, Hideo ; IKEGUCHI, Mitsunori ; HISABORI, Toru: Structural and functional analysis of the intrinsic inhibitor subunit ϵ of F₁-ATPase from photosynthetic organisms. In: *Biochem. J.* 425 (2010), 85–94.
- [428] SUHAI, T. ; DENCHER, N. A. ; POETSCH, A. ; SEELERT, H.: Remarkable stability of the proton translocating F₁F₀-ATP synthase from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008), S. 1131–40.
- [429] HOLTZHAUER, M.: *Biochemische Labormethoden*. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York : Springer-Verlag, 1995.
- [430] GREMMINGER, U.: *Die H⁺-ATPase aus Chloroplasten - Untersuchungen zur Aktivierungsenergie der ATP-Synthese an rekonstituierten Proteoliposomen*, Universität Stuttgart, Diplomarbeit, 1993.
- [431] INOUE, Satoshi: Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions. In: *Cell Mol. Life Sci.* 67 (2010), 387–404.
- [432] SAZANOV, L. A. ; HINCHLIFFE, P.: Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. In: *Science* 311 (2006), S. 1430–6.
- [433] FROMME, P. ; BOEKEMA, E. J. ; GRÄBER, P.: Isolation and characterization of a supramolecular complex of subunit III of the ATP synthase from chloroplasts. In: *Z. Naturforsch. (C)* 42c (1987), S. 1239–1245.
- [434] LILL, H. ; JUNGE, W.: Identification of a proteolipid oligomer as a constituent part of CF₀, the proton channel of the chloroplast ATP synthase. In: *FEBS Lett.* 244 (1989), 15–20.
- [435] POETSCH, A. ; REXROTH, S. ; HEBERLE, J. ; LINK, T. A. ; DENCHER, N. A. ; SEELERT, H.: Characterisation of subunit III and its oligomer from spinach chloroplast ATP synthase. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1618 (2003), S. 59–66.
- [436] POGORYELOV, D. ; YU, J. ; MEIER, T. ; VONCK, J. ; DIMROTH, P. ; MÜLLER, D. J.: The c₁₅ ring of the *Spirulina platensis* F-ATP synthase: F₁/F₀ symmetry mismatch is not obligatory. In: *EMBO Rep.* 6 (2005), S. 1040–4.
- [437] POGORYELOV, D. ; REICHEN, C. ; KLYSZEJKO, A. L. ; BRUNISHOLZ, R. ; MÜLLER, D. J. ; DIMROTH, P. ; MEIER, T.: The oligomeric state of c rings from cyanobacterial F-ATP synthases varies from 13 to 15. In: *J. Bacteriol.* 189 (2007), S. 5895–902.
- [438] VARCO-MERTH, B. ; FROMME, R. ; WANG, M. ; FROMME, P.: Crystallization of the c₁₄-rotor of the chloroplast ATP synthase reveals that it contains pigments. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (2008), S. 605–12.
- [439] MEIER, T. ; MATTHEY, U. ; BALLMOOS, C. von ; VONCK, J. ; NIDDA, T. Krug v. ; KÜHLBRANDT, W. ; DIMROTH, P.: Evidence for structural integrity in the undecameric c-rings isolated from sodium ATP synthases. In: *J. Mol. Biol.* 325 (2003), S. 389–97.
- [440] MEIER, T. ; POLZER, P. ; DIEDERICH, K. ; WELTE, W. ; DIMROTH, P.: Structure of the rotor ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. In: *Science* 308 (2005), S. 659–62.
- [441] FENG, Y. ; McCARTY, R. E.: Purification and reconstitution of active chloroplast F₀. In: *J. Biol. Chem.* 265 (1990), S. 5104–9.

- [442] GROTJOHANN, I. ; GRÄBER, P.: Isolation and properties of the membrane-integrated part of the ATP-synthase from chloroplasts, CF_O. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1017 (1990), S. 177–180.
- [443] GALMICHE, J. M. ; PEZENNEC, S. ; ZHAO, R. ; GIRAULT, G. ; BAEUERLEIN, E.: The prokaryotic thermophilic TF₁-ATPase is functionally compatible with the eukaryotic CF_O-part of the chloroplast ATP-synthase. In: *FEBS Lett.* 338 (1994), S. 152–6.
- [444] FIEDLER, H. R. ; PONOMARENKO, S. ; GEHLEN, N. von ; STROTMANN, H.: Proton gradient-induced changes of the interaction between CF_O and CF₁ as probed by cleavage with NaSCN. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1188 (1994), S. 29–34.
- [445] REXROTH, Sascha: *Isolierung und Charakterisierung von Subkomplexen der Chloroplasten-ATP-Synthase*, Technische Universität Darmstadt, Diplomarbeit, 2000.
- [446] SEELERT, H. ; DENCHER, N. A. ; MÜLLER, D. J.: Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase. In: *J. Mol. Biol.* 333 (2003), S. 337–44.
- [447] MEIER, T. ; MORGNER, N. ; MATTHIES, D. ; POGORYELOV, D. ; KEIS, S. ; COOK, G. M. ; DIMROTH, P. ; BRUTSCHY, B.: A tridecameric c ring of the adenosine triphosphate (ATP) synthase from the thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TA2.A1 facilitates ATP synthesis at low electrochemical proton potential. In: *Mol. Microbiol.* 65 (2007), S. 1181–92.
- [448] TIBURZY, H. J. ; BERZBORN, R. J.: Subunit II (b') and not subunit I (b) of photosynthetic ATP synthases is equivalent to subunit b of the ATP synthases from nonphotosynthetic eubacteria. Evidence for a new assignment of b-type F_O subunits. In: *Z Naturforsch [C]* 52 (1997), S. 789–98.
- [449] POETSCH, A. ; BERZBORN, R. J. ; HEBERLE, J. ; LINK, T. A. ; DENCHER, N. A. ; SEELERT, H.: Biophysics and Bioinformatics Reveal Structural Differences of the Two Peripheral Stalk Subunits in Chloroplast ATP Synthase. In: *J. Biochem. (Tokyo)* 141 (2007), S. 411–420.
- [450] GERTZ, M. ; SEELERT, H. ; DENCHER, N. A. ; POETSCH, A.: Interactions of rotor subunits in the chloroplast ATP synthase modulated by nucleotides and by Mg²⁺. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1774 (2007), S. 566–74.
- [451] GRANDIER-VAZEILLE, X. ; GUÉRIN, M.: Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes. In: *Anal. Biochem.* 242 (1996), S. 248–54.
- [452] SUHAI, Tina ; HEIDRICH, Nicolas G. ; DENCHER, Norbert A. ; SEELERT, Holger: Highly sensitive detection of ATPase activity in native gels. In: *Electrophoresis* 30 (2009), 3622–3625.
- [453] SUHAI, Tina: *Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von F_OF₁-ATP-Synthasen aus Cyanobakterien und Grünalgen*, Technische Universität Darmstadt, Dissertation, 2008.
- [454] SEELERT, H. ; REXROTH, S. ; DENCHER, N. A. ; MÜLLER, D. J. ; KÜHLBRANDT, W. ; VONCK, J.: Characterization of the α -helices in the proton turbine of chloroplast F_OF₁ ATP synthase. In: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler Suppl.* 382 (2001), S. S147.
- [455] EISFELD, Jochen: *Der Membranteil von H⁺-ATPasen: Struktur des CF_O aus Spinatchloroplasten, Funktion des EF_O aus E. coli*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Dissertation, 2003.
- [456] VOLLMAR, Melanie ; SCHLIEPER, Daniel ; WINN, Martyn ; BÜCHNER, Claudia ; GROTH, Georg: Structure of the c₁₄ Rotor Ring of the Proton Translocating Chloroplast ATP Synthase. In: *J. Biol. Chem.* 284 (2009), 18228–18235.
- [457] TURINA, P. ; SAMORAY, D. ; GRÄBER, P.: H⁺/ATP ratio of proton transport-coupled ATP synthesis and hydrolysis catalysed by CF_OF₁-liposomes. In: *EMBO J.* 22 (2003), S. 418–26.
- [458] STEIGMILLER, S. ; TURINA, P. ; GRÄBER, P.: The thermodynamic H⁺/ATP ratios of the H⁺-ATPsynthases from chloroplasts and *Escherichia coli*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008), S. 3745–50.
- [459] LAISK, A. ; EICHELMANN, H. ; OJA, V. ; TALTS, E. ; SCHEIBE, R.: Rates and roles of cyclic and alternative electron flow in potato leaves. In: *Plant Cell Physiol.* 48 (2007), S. 1575–88.
- [460] NELSON, N. ; SACHER, A. ; NELSON, H.: The significance of molecular slips in transport systems. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002), S. 876–81.
- [461] GROTH, G. ; JUNGE, W.: Proton slip of the chloroplast ATPase: its nucleotide dependence, energetic threshold, and relation to an alternating site mechanism of catalysis. In: *Biochemistry* 32 (1993), S. 8103–8111.
- [462] RICHTER, M. ; DAUFENBACH, J. ; DREBING, S. ; VUCETIC, V. ; NGUYEN, D. T.: Light-induced proton slip and proton leak at the thylakoid membrane. In: *J. Plant Physiol.* 161 (2004), S. 1325–37.
- [463] FENIOUK, Boris A. ; MULKIDJANIAN, Armen Y. ; JUNGE, Wolfgang: Proton slip in the ATP synthase of *Rhodobacter capsulatus*: induction, proton conduction, and nucleotide dependence. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1706 (2005), 184–194.
- [464] WITTIG, I. ; VELOURS, J. ; STUART, R. ; SCHÄGGER, H.: Characterization of domain interfaces in monomeric and dimeric ATP synthase. In: *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008), S. 995–1004.
- [465] DÜSER, Monika G. ; BI, Yumin ; ZARRABI, Nawid ; DUNN, Stanley D. ; BÖRSCH, Michael: The proton-translocating a subunit of F_OF₁-ATP synthase is allocated asymmetrically to the peripheral stalk. In: *J. Biol. Chem.* 283 (2008), 33602–33610.
- [466] MEIER, T. ; MATTHEY, U. ; HENZEN, F. ; DIMROTH, P. ; MÜLLER, D. J.: The central plug in the reconstituted undecameric c cylinder of a bacterial ATP synthase consists of phospholipids. In: *FEBS Lett.* 505 (2001), S. 353–356.
- [467] MÜLLER, D. J. ; DENCHER, N. A. ; MEIER, T. ; DIMROTH, P. ; SUDA, K. ; STAHLBERG, H. ; ENGEL, A. ; SEELERT, H. ; MATTHEY, U.: ATP synthase: constrained stoichiometry of the transmembrane rotor. In: *FEBS Lett.* 504 (2001), S. 219–22.

- [468] DRAPIER, Dominique ; RIMBAULT, Blandine ; VALLON, Olivier ; WOLLMAN, Francis-André ; CHOQUET, Yves: Intertwined translational regulations set uneven stoichiometry of chloroplast ATP synthase subunits. In: *EMBO J.* 26 (2007), 3581–3591.
- [469] KREBSTAKIES, T. ; ALDAG, I. ; ALTENDORF, K. ; GREIE, J. C. ; DECKERS-HEBESTREIT, G.: The stoichiometry of subunit c of *Escherichia coli* ATP synthase is independent of its rate of synthesis. In: *Biochemistry* 47 (2008), S. 6907–16.
- [470] BALLHAUSEN, Britta ; ALTENDORF, Karlheinz ; DECKERS-HEBESTREIT, Gabriele: Constant c_{10} ring stoichiometry in the *Escherichia coli* ATP synthase analyzed by cross-linking. In: *J. Bacteriol.* 191 (2009), 2400–2404.
- [471] MEIER, T. ; YU, J. ; RASCHLE, T. ; HENZEN, F. ; DIMROTH, P. ; MÜLLER, D. J.: Structural evidence for a constant c_1 ring stoichiometry in the sodium F-ATP synthase. In: *FEBS J.* 272 (2005), S. 5474–83.
- [472] MCMILLAN, D. G. ; KEIS, S. ; DIMROTH, P. ; COOK, G. M.: A specific adaptation in the a subunit of thermoalkaliphilic F_1F_0 -ATP synthase enables ATP synthesis at high pH but not at neutral pH values. In: *J. Biol. Chem.* 282 (2007), S. 17395–404.
- [473] JIANG, W. ; HERMOLIN, J. ; FILLINGAME, R. H.: The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001), S. 4966–71.
- [474] MITOME, N. ; SUZUKI, T. ; HAYASHI, S. ; YOSHIDA, M.: Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: Indication of noninteger 10:3 H^+ /ATP ratio and permissive elastic coupling. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004), S. 12159–64.
- [475] STAHLBERG, H. ; MÜLLER, D. J. ; SUDA, K. ; FOTIADIS, D. ; ENGEL, A. ; MEIER, T. ; MATTHEY, U. ; DIMROTH, P.: Bacterial Na^+ -ATP synthase has an undecameric rotor. In: *EMBO Rep.* 2 (2001), S. 229–33.
- [476] MEIER, T. ; FERGUSON, S. A. ; COOK, G. M. ; DIMROTH, P. ; VONCK, J.: Structural investigations of the membrane-embedded rotor ring of the F-ATPase from *Clostridium paradoxum*. In: *J. Bacteriol.* 188 (2006), S. 7759–64.
- [477] FRITZ, M. ; KLYSZEJKO, A. L. ; MORGNER, N. ; VONCK, J. ; BRUTSCHY, B. ; MÜLLER, D. J. ; MEIER, T. ; MÜLLER, V.: An intermediate step in the evolution of ATPases: a hybrid F_0 -VO rotor in a bacterial Na^+ F_1F_0 ATP synthase. In: *FEBS J.* 275 (2008), S. 1999–2007.
- [478] MEIER, Thomas ; KRAH, Alexander ; BOND, Peter J. ; POGORYELOV, Denys ; DIEDERICH, Kay ; FARALDO-GÓMEZ, José D.: Complete ion-coordination structure in the rotor ring of Na^+ -dependent F-ATP synthases. In: *J. Mol. Biol.* 391 (2009), 498–507.
- [479] MURATA, T. ; YAMATO, I. ; KAKINUMA, Y. ; LESLIE, A. G. ; WALKER, J. E.: Structure of the rotor of the V-Type Na^+ -ATPase from *Enterococcus hirae*. In: *Science* 308 (2005), S. 654–9.
- [480] TOEI, M. ; GERLE, C. ; NAKANO, M. ; TANI, K. ; GYOBU, N. ; TAMAKOSHI, M. ; SONE, N. ; YOSHIDA, M. ; FUJIYOSHI, Y. ; MITSUOKA, K. ; YOKOYAMA, K.: Dodecamer rotor ring defines H^+ /ATP ratio for ATP synthesis of prokaryotic V-ATPase from *Thermus thermophilus*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007), S. 20256–61.
- [481] MATTHIES, Doreen ; PREISS, Laura ; KLYSZEJKO, Adriana L. ; MÜLLER, Daniel J. ; COOK, Gregory M. ; VONCK, Janet ; MEIER, Thomas: The c_3 ring from a thermoalkaliphilic ATP synthase reveals an extended diameter due to a special structural region. In: *J. Mol. Biol.* 388 (2009), 611–618.
- [482] POGORYELOV, Denys ; YILDIZ, Ozkan ; FARALDO-GÓMEZ, José D. ; MEIER, Thomas: High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009), 1068–1073.
- [483] TIKHONOV, Alexander N. ; AGAFONOV, Roman V. ; GRIGOR'EV, Igor A. ; KIRILYUK, Igor A. ; PTUSHENKO, Vasilii V. ; TRUBITSIN, Boris V.: Spin-probes designed for measuring the intrathylakoid pH in chloroplasts. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (2008), 285–294.
- [484] FISCHER, S. ; GRÄBER, P.: Comparison of Δ pH- and $\Delta\phi$ -driven ATP synthesis catalyzed by the H^+ -ATPases from *Escherichia coli* or chloroplasts reconstituted into liposomes. In: *FEBS Lett.* 457 (1999), S. 327–332.
- [485] CRUZ, J. A. ; SACKSTEDER, C. A. ; KANAZAWA, A. ; KRAMER, D. M.: Contribution of electric field $\Delta\psi$ to steady-state transthylakoid proton motive force (pmf) in vitro and in vivo. control of pmf parsing into $\Delta\psi$ and Δ pH by ionic strength. In: *Biochemistry* 40 (2001), S. 1226–1237.
- [486] BALLMOOS, C. von ; COOK, G. M. ; DIMROTH, P.: Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. In: *Annu. Rev. Biophys.* 37 (2008), S. 43–64.
- [487] KAIM, G. ; DIMROTH, P.: ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage. In: *EMBO J.* 18 (1999), S. 4118–27.
- [488] LIS, R. van ; ATTEIA, A. ; MENDOZA-HERNANDEZ, G. ; GONZALEZ-HALPHEN, D.: Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. In: *Plant Physiol.* 132 (2003), S. 318–30.
- [489] EUBEL, H. ; JÄNSCH, L. ; BRAUN, H. P.: New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. In: *Plant Physiol.* 133 (2003), S. 274–86.
- [490] VÁZQUEZ-ACEVEDO, M. ; CARDOL, P. ; CANO-ESTRADA, A. ; LAPAILLE, M. ; REMACLE, C. ; GONZÁLEZ-HALPHEN, D.: The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 38 (2006), S. 271–82.
- [491] LIS, Robert van ; MENDOZA-HERNÁNDEZ, Guillermo ; GROTH, Georg ; ATTEIA, Ariane: New insights into the unique structure of the F_0F_1 -ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Plant Physiol.* 144 (2007), 1190–1199.

- [492] VILLAVICENCIO-QUEIJEIRO, Alexa ; VÁZQUEZ-ACEVEDO, Miriam ; CANO-ESTRADA, Araceli ; ZARCO-ZAVALA, Mariel ; GÓMEZ, Marietta T. ; MIGNACO, Julio A. ; FREIRE, Monica M. ; SCOFANO, Helena M. ; FOGUEL, Debora ; CARDOL, Pierre ; REMACLE, Claire ; GONZÁLEZ-HALPHEN, Diego: The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (2009), 1–13.
- [493] DUDKINA, N. V. ; HEINEMEYER, J. ; KEEGSTRA, W. ; BOEKEMA, E. J. ; BRAUN, H. P.: Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: An angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. In: *FEBS Lett.* 579 (2005), S. 5769–72.
- [494] MINAURO-SANMIGUEL, F. ; WILKENS, S. ; GARCIA, J. J.: Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F_0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005), S. 12356–8.
- [495] DUDKINA, N. V. ; SUNDERHAUS, S. ; BRAUN, H. P. ; BOEKEMA, E. J.: Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. In: *FEBS Lett.* 580 (2006), S. 3427–32.
- [496] DEVENISH, R. J. ; PRESCOTT, M. ; RODGERS, A. J.: The structure and function of mitochondrial F_1F_0 -ATP synthases. In: *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 267 (2008), S. 1–58.
- [497] THOMAS, D. ; BRON, P. ; WEIMANN, T. ; DAUTANT, A. ; GIRAUD, M. F. ; PAUMARD, P. ; SALIN, B. ; CAVALIER, A. ; VELOURS, J. ; BRETHES, D.: Supramolecular organization of the yeast F_1F_0 -ATP synthase. In: *Biol. Cell* 100 (2008), S. 591–601.
- [498] BUZHINSKY, N. ; SENS, P. ; PRIMA, V. ; STURGIS, J. N. ; SCHEURING, S.: Rows of ATP synthase dimers in native mitochondrial inner membranes. In: *Biophys. J.* 93 (2007), S. 2870–6.
- [499] STRAUSS, M. ; HOFHAUS, G. ; SCHRÖDER, R. R. ; KÜHLBRANDT, W.: Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. In: *EMBO J.* 27 (2008), S. 1154–60.
- [500] DUDKINA, Natalya V. ; OOSTERGETEL, Gert T. ; LEWEJOHANN, Dagmar ; BRAUN, Hans-Peter ; BOEKEMA, Egbert J.: Row-like organization of ATP synthase in intact mitochondria determined by cryo-electron tomography. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010), 272–277.
- [501] SOUZA, Manuela O. ; CRECZYNSKI-PASA, Tânia B. ; SCOFANO, Helena M. ; GRÄBER, Peter ; MIGNACO, Julio A.: High hydrostatic pressure perturbs the interactions between CF_0F_1 subunits and induces a dual effect on activity. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004), 920–930.
- [502] SCHWASSMANN, H. J. ; REXROTH, S. ; SEELERT, H. ; DENCHER, N. A.: Metabolism controls dimerization of the chloroplast F_0F_1 ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *FEBS Lett.* 581 (2007), S. 1391–1396.
- [503] PENG, Lianwei ; FUKAO, Yoichiro ; FUJIWARA, Masayuki ; TAKAMI, Tsuneaki ; SHIKANAI, Toshiharu: Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*. In: *Plant Cell* 21 (2009), 3623–3640.
- [504] PENG, Lianwei ; SHIMIZU, Hideyuki ; SHIKANAI, Toshiharu: The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in *Arabidopsis*. In: *J. Biol. Chem.* 283 (2008), 34873–34879.
- [505] ULRICH, Andrea: *Isolierung und Charakterisierung von mitochondrialen Membranproteinen aus Chlamydomonas reinhardtii und Euglena gracilis*, Technische Universität Darmstadt, Diplomarbeit, 2008.
- [506] SCHWASSMANN, Helena: *Analyse von Atmungskettenkomplexen aus Organellen von Chlamydomonas reinhardtii und Rattus norvegicus*, Technische Universität Darmstadt, Dissertation, 2010.
- [507] EUBEL, H. ; HEINEMEYER, J. ; SUNDERHAUS, S. ; BRAUN, H. P.: Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. In: *Plant Physiol. Biochem.* 42 (2004), S. 937–42.
- [508] PETERS, K. ; DUDKINA, N. V. ; JÄNSCH, L. ; BRAUN, H. P. ; BOEKEMA, E. J.: A structural investigation of complex I and I+III₂ supercomplex from *Zea mays* at 11–13 Å resolution: assignment of the carbonic anhydrase domain and evidence for structural heterogeneity within complex I. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (2008), S. 84–93.
- [509] SUNDERHAUS, Stephanie ; KLODMANN, Jennifer ; LENZ, Christof ; BRAUN, Hans-Peter: Supramolecular structure of the OXPHOS system in highly thermogenic tissue of *Arum maculatum*. In: *Plant Physiol. Biochem.* 48 (2010), 265–272.
- [510] EUBEL, H. ; HEINEMEYER, J. ; BRAUN, H. P.: Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. In: *Plant Physiol.* 134 (2004), S. 1450–9.
- [511] BULTEMA, Jelle B. ; BRAUN, Hans-Peter ; BOEKEMA, Egbert J. ; KOUŘIL, Roman: Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009), 60–67.
- [512] AMARNEH, Bilal ; VIK, Steven B.: Direct transfer of NADH from malate dehydrogenase to complex I in *Escherichia coli*. In: *Cell Biochem. Biophys.* 42 (2005), 251–261.
- [513] BRAUN, Jennifer: *Isolierung von Membranproteinsuperkomplexen*, Technische Universität Darmstadt, Diplomarbeit, 2006.
- [514] SCHÄFER, E. ; SEELERT, H. ; REIFSCHNEIDER, N. H. ; KRAUSE, F. ; DENCHER, N. A. ; VONCK, J.: Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. In: *J. Biol. Chem.* 281 (2006), S. 15370–5.
- [515] ACÍN-PÉREZ, R. ; FERNÁNDEZ-SILVA, P. ; PELEATO, M. L. ; PÉREZ-MARTOS, A. ; ENRIQUEZ, J. A.: Respiratory active mitochondrial supercomplexes. In: *Mol. Cell* 32 (2008), S. 529–39.
- [516] TSUKIHARA, T. ; AOYAMA, H. ; YAMASHITA, E. ; TOMIZAKI, T. ; YAMAGUCHI, H. ; SHINZAWA-ITO, K. ; NAKASHIMA, R. ; YAONO, R. ; YOSHIKAWA, S.: The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. In: *Science* 272 (1996), S. 1136–44.

-
- [517] DUDKINA, N. V ; EUBEL, H. ; KEEGSTRA, W. ; BOEKEMA, E. J. ; BRAUN, H. P: Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005), S. 3225–9.
- [518] SCHÄFER, E. ; DENCHER, N. A. ; VONCK, J. ; PARCEJ, D. N.: Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I₁III₂IV₁ from bovine heart mitochondria. In: *Biochemistry* 46 (2007), S. 12579–85.
- [519] STUART, Rosemary A.: Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 40 (2008), 411–417.
- [520] HEINEMEYER, J. ; BRAUN, H. P. ; BOEKEMA, E. J. ; KOUŘIL, R.: A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. In: *J. Biol. Chem.* 282 (2007), S. 12240–8.
- [521] SUNDERHAUS, Stephanie ; DUDKINA, Natalya V. ; JÄNSCH, Lothar ; KLODMANN, Jennifer ; HEINEMEYER, Jesco ; PERALES, Mariano ; ZABALETA, Eduardo ; BOEKEMA, Egbert J. ; BRAUN, Hans-Peter: Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants. In: *J. Biol. Chem.* 281 (2006), 6482–6488.
- [522] KLODMANN, Jennifer ; SUNDERHAUS, Stephanie ; NIMTZ, Manfred ; JÄNSCH, Lothar ; BRAUN, Hans-Peter: Internal architecture of mitochondrial complex I from *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Cell* 22 (2010), 797–810.
- [523] KRAUSE, F. ; SCHECKHUBER, C. Q. ; WERNER, A. ; REXROTH, S. ; REIFSCHNEIDER, N. H. ; DENCHER, N. A. ; OSIEWACZ, H. D.: Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2004), S. 26453–61.
- [524] MARQUES, I. ; DENCHER, N. A. ; VIDEIRA, A. ; KRAUSE, F.: Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria. In: *Eukaryot Cell* 6 (2007), S. 2391–405.
- [525] NÜBEL, Esther ; WITTIG, Ilka ; KERSCHER, Stefan ; BRANDT, Ulrich ; SCHÄGGER, Hermann: Two-dimensional native electrophoretic analysis of respiratory supercomplexes from *Yarrowia lipolytica*. In: *Proteomics* 9 (2009), 2408–2418.
- [526] TRINEL, Mirella ; VANNIER, Jean-Pierre ; BEURTON-AIMAR, Marie ; NORRIS, Vic: A hyperstructure approach to mitochondria. In: *Mol. Microbiol.* 53 (2004), 41–53.
- [527] FRESE, R. N. ; SIEBERT, C. A. ; NIEDERMAN, R. A. ; HUNTER, C. N. ; OTTO, C. ; GRONDELLE, R. van: The long-range organization of a native photosynthetic membrane. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004), S. 17994–9.
- [528] SENER, M. K. ; OLSEN, J. D. ; HUNTER, C. N. ; SCHULTEN, K.: Atomic-level structural and functional model of a bacterial photosynthetic membrane vesicle. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007), S. 15723–8.
- [529] IWAI, Masakazu ; TAKIZAWA, Kenji ; TOKUTSU, Ryutaro ; OKAMURO, Akira ; TAKAHASHI, Yuichiro ; MINAGAWA, Jun: Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. In: *Nature* 464 (2010), 1210–1213.

Teil II

Kumulativer Teil

A Eigene Publikationen

A.1 Farbstoff-Entfernung, katalytische Aktivität und 2D-Kristallisation der Chloroplasten-H⁺-ATP-Synthase gereinigt durch blau-native Elektrophorese

Dye removal, catalytic activity and 2D crystallization of chloroplast H⁺-ATP synthase purified by blue native electrophoresis

A. Poetsch, D. Neff, H. Seelert, H. Schagger und N. A. Dencher
Biochim. Biophys. Acta 1466 (2000) 339-349

Literaturstelle im vorangehenden Text: [391]

Zusammenfassung

Die Protonen-ATP-Synthase aus Thylakoidmembranen von Spinat-Chloroplasten (CF₀F₁) und ihre Subkomplexe CF₀ und CF₁ wurde durch blau-native Elektrophorese (BN-PAGE) isoliert [Neff, D. und Dencher, N.A. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 569-575] und anschließend aus dem Gel elektroeluiert. Basierend auf der Gelfiltration wurde eine Methode entwickelt, um die Hauptmenge des Farbstoffs Coomassie G-250 (CBG) zu entfernen, als Voraussetzung für viele biophysikalische Untersuchungen. Der Farbstoff wurde aus elektroeluiertem CF₀F₁, CF₀ oder CF₁ entfernt und durch das Detergens CHAPS ausgetauscht. Die ATP-Hydrolyse-Aktivität von CF₁ und die ATP-Synthase-Aktivität von rekonstituiertem CF₀F₁ wurden vor und nach der Farbstoff-Entfernung ermittelt. Die Sekundärstruktur von CF₀ wurde durch CD-Spektroskopie in Anwesenheit und Abwesenheit des Farbstoffs untersucht. CBG verhindert weder die katalytische Aktivität (für isoliertes CF₀F₁ und CF₁), noch beeinflusste es die Untereinheiten-Zusammensetzung und den hohen α -Helix-Gehalt von CF₀. Bei Kristallisationsansätzen konnten 2D-Strukturen von CF₀F₁ und von CF₀ sowohl vor als auch nach der Farbstoff-Entfernung erhalten werden. In den Aggregaten von CF₀ wurden runde Strukturen mit einem mittleren Durchmesser von 6,7 nm beobachtet. Unsere Ergebnisse belegen, dass die Kombination von BN-PAGE und Farbstoff-Entfernung durch Gelfiltration eine nützliche Methode ist, um katalytisch aktive Proteinkomplexe für weitere funktionelle und strukturelle Untersuchungen zu erhalten.

A.2 Strukturbiologie: Protonen-getriebene Turbine eines Pflanzen-Motors

Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor

H. Seelert, A. Poetsch, N.A. Dencher, A. Engel, H. Stahlberg und D.J. Müller

Nature 405 (2000) 418-419

Literaturstelle im vorangehenden Text: [220]

Zusammenfassung

Wir isolierten das rotierende Oligomer III_x aus Präparationen der Spinat-Chloroplasten-ATP-Synthase und rekonstituierten es bei hohen Protein-zu-Lipid-Verhältnissen in zweidimensionale Gitter. Bei der Untersuchung der Topographie von dicht-gepackten Oligomeren der Untereinheit III mittels Kontaktmodus-Raster-Kraft-Mikroskopie zeigten sich alternierende ring-ähnliche Strukturen mit zwei unterschiedlichen Durchmessern. Auf den AFM-Aufnahmen ist sowohl direkt als auch durch computergestützte Mittelung erkennbar, dass die Protonenturbine der Chloroplasten-ATP-Synthase eine asymmetrische zylindrische Struktur mit 14 symmetrisch verteilten Untereinheiten ist.

A.3 ATP-Synthase: eingeschränkte Stöchiometrie des Transmembranrotors

ATP synthase: constrained stoichiometry of the transmembrane rotor

D.J. Müller, N.A. Dencher, T. Meier, P. Dimroth, K. Suda, H. Stahlberg, A. Engel, H. Seelert und U. Matthey

FEBS Lett. 504 (2001) 219-222

Literaturstelle im vorangehenden Text: [467]

Zusammenfassung

Aus aktuellen Strukturdaten lässt sich folgern, dass die Anzahl identischer Untereinheiten (c oder III) im Kationen-getriebenen Rotor von F_1F_0 -ATP-Synthasen von der biologischen Herkunft abhängen. Die Raster-Kraft-Mikroskopie erlaubte die direkte Visualisierung einzelner Untereinheiten der zylindrischen Transmembran-Rotoren aus der Spinat-Chloroplasten- und *Ilyobacter tartaricus*-ATP-Synthase in einer nahezu nativen Umgebung. Manchmal zeigten einzelne Rotoren eine strukturelle Lücke mit der Größe von einer oder mehreren Untereinheiten. Vollständige Rotoren oder bogenförmige Fragmente der unvollständigen Rotoren ergaben den gleichen Durchmesser innerhalb einer ATP-Synthase-Spezies. Diese Ergebnisse belegen, dass der Rotordurchmesser und die Stöchiometrie von der Form der Untereinheiten und ihren Wechselwirkungen mit den nächsten Nachbarn bestimmt wird.

A.4 Charakterisierung der Untereinheit III und ihres Oligomers aus der Spinat-Chloroplasten-ATP-Synthase

Characterisation of subunit III and its oligomer from spinach chloroplast ATP synthase

A. Poetsch, S. Rexroth, J. Heberle, T.A. Link, N.A. Dencher und H. Seelert

Biochim. Biophys. Acta 1618 (2003) 59-66

Literaturstelle im vorangehenden Text:[435]

Zusammenfassung

Protonen-ATP-Synthasen sind für die Energieumwandlung in Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien zuständig. Ein Schlüsselement des membranintegralen Motors CF_O in Chloroplasten ist das Oligomer der Untereinheit III: es wandelt die Energie eines transmembranen elektrochemischen Protonengradienten in eine Rotationsbewegung um. Um die besonderen Eigenschaften der Struktur-Funktions-Beziehung von Untereinheit III aus Spinatchloroplasten zu ermitteln, wurden neue Isolierungsmethoden etabliert, durch welche hoch-reine monomere und oligomere Untereinheit III in Milligramm-Mengen erhalten wird. Durch Fourier-Transform-Infrarot- (FTIR) und CD-Spektroskopie konnte die vorwiegend α -helikale Sekundärstruktur von Untereinheit III gezeigt werden. Für das Monomer III wurde eine Konformationsänderung beim Verdünnen des SDS-solubilisierten Proteins festgestellt. Unter den gleichen Bedingungen veränderte sich die Konformation des III-Oligomers aber nicht. Die Masse der monomeren Untereinheit III betrug 8003 Da, ermittelt durch MALDI Massenspektrometrie (MALDI-MS). Dies zeigt, dass keine posttranslationalen Modifizierungen auftraten. Durch die Ionisierung während der MALDI-MS zerfiel das nichtkovalent-verknüpfte Homooligomer III₁₄ in seine III-Monomere.

A.5 Die Thylakoidmembran bei verändertem metabolischem Zustand: Herausforderung der Vergessenen Reiche des Proteoms

Thylakoid membrane at altered metabolic state: Challenging the forgotten realms of the proteome

S. Rexroth, J. M. W. Meyer zu Tittingdorf, F. Krause, N. A. Dencher und H. Seelert
Electrophoresis 24 (2003) 2814-2823

Literaturstelle im vorangehenden Text: [413]

Zusammenfassung

Die Analyse des membranintegralen Proteoms hängt hauptsächlich von der geeigneten Auftrennung der Proteine ab. Die blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) ist eine Methode, die in der Lage ist, Membranproteine effizient zu trennen. Allerdings beschränkte sich ihre Anwendung größtenteils auf die mitochondriale Maschinerie der oxidativen Phosphorylierung. Durch Einsatz der BN-PAGE auf Thylakoidmembranen nach milder Solubilisierung mit Digitonin konnten wir erfolgreich die Antwort der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* auf geänderte Kultivierungsbedingungen verfolgen. Zusätzlich wurden durch „peptide mass fingerprinting“ und Matrix-unterstützte Laserdesorption/ionisierungs-Massenspektrometrie (MALDI-MS) extrem hydrophobe Untereinheiten der Photosystemkomplexe mit 5–11 Transmembranhelices identifiziert, welche in vorangehenden Untersuchungen noch nicht beim *in-Gel*-Verdau erfasst wurden.

A.6 Vierzehn Protomere bilden das Oligomer III des Protonenrotors der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat

Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase

H. Seelert, N.A. Dencher und D.J. Müller
J. Mol. Biol. 333 (2003) 337-344

Literaturstelle im vorangehenden Text: [446]

Zusammenfassung

Drei ganz unterschiedliche Chloroplasten-ATP-Synthase-Proben mit steigender Komplexität wurden durch Raster-Kraft-Mikroskopie visualisiert. Die Proben unterschieden sich in Bezug auf die Isolierungsmethode, das verwendete Detergens und die resultierende Untereinheiten-Zusammensetzung. Das Homooligomer III wurde nach einer SDS-Behandlung der ATP-Synthase isoliert. Die Protonenturbine III + IV wurde durch blau-native Elektrophorese erhalten und vollständiges CF₀ durch Anionenaustausch-Chromatographie einer NaSCN-gespaltenen ATP-Synthase isoliert. In allen drei ATP-Synthase-Subkomplexen bildeten 14 und nur 14 ringförmig angeordnete Untereinheiten III den intakten Transmembranrotor. Daher besteht die membranständige Protonenturbine aus 14 Protomeren. Die beobachtete Stöchiometrie von 14 ist also kein biochemisches Artefakt oder wird durch natürliche Variationen beim Wachstum des Spinats beeinflusst, wie zuvor vorgeschlagen. Bei den untersuchten Proben wurde eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von Untereinheit IV und dem Aussehen der zentralen Vertiefung bei den Oligomer-Zylindern III₁₄ mit engerer Öffnung beobachtet. Im Gegensatz zu aktuellen Vorhersagen kann die Untereinheit IV im Chloroplasten-F₀ im Inneren der III₁₄-Zylinder und nicht an ihrer Peripherie gefunden werden, zumindest bei den untersuchten rekonstituierten 2D-Gittern.

A.7 Die Stöchiometrie des Oligomers III der Chloroplasten-ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* wird nicht durch den metabolischen Zustand beeinflusst

The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in *Chlamydomonas reinhardtii* is not affected by the metabolic state

J.M.W. Meyer zu Tittingdorf, S. Rexroth, E. Schäfer, R. Schlichting, C. Giersch, N. A. Dencher und
H. Seelert

Biochim. Biophys. Acta 1659 (2004) 92-99

Literaturstelle im vorangehenden Text: [415]

Zusammenfassung

Die Chloroplasten- H^+ -ATP-Synthase ist eine Schlüsselkomponente für die Energieversorgung höherer Pflanzen und Grünalgen. Ein Oligomer aus identischen Proteinuntereinheiten III ist für die Umwandlung eines elektrochemischen Protonengradienten in Rotationsbewegung verantwortlich. Es ist höchst kontrovers, ob die Stöchiometrie des Oligomers III durch den metabolischen Zustand eines Organismus beeinflusst wird. Zum ersten Mal konnte hier das intakte Oligomer III der ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* isoliert werden. Aufgrund der Bedeutung der Stöchiometrie von Untereinheit III bei der Energieumwandlung wurde ein Gradientengelsystem etabliert, um Oligomere mit unterschiedlichen Stöchiometrien zu unterscheiden. Mit dieser Methode wurde die mögliche Veränderlichkeit der Stöchiometrie in Hinblick auf den metabolischen Zustand der Zellen untersucht. Mehrere Wachstumsparameter, d.h. die Lichtintensität, der pH-Wert, die Kohlenstoffquelle und die CO_2 -Konzentration wurden variiert um ihre Auswirkungen auf die Stöchiometrie zu ermitteln. Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen für *E. coli* bestand das Oligomer III der Chloroplasten- H^+ -ATP-Synthase immer aus einer konstanten Anzahl Monomere über einen großen Bereich metabolischer Zustände. Außerdem zeigte die Massenspektrometrie, dass Untereinheit III aus *C. reinhardtii* nicht posttranslational modifiziert ist. Die Daten legen nahe, dass die Stöchiometrie der Untereinheit III von ATP-Synthasen aus Algen anders ist als bei höheren Pflanzen.

A.8 Dimere der H⁺-ATP-Synthase im Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii*

Dimeric H⁺-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*

S. Rexroth, J.M.W. Meyer zu Tittingdorf, H.J. Schwaßmann, F. Krause, H. Seelert und N.A. Dencher
Biochim. Biophys. Acta 1658 (2004) 202-211

Literaturstelle im vorangehenden Text: [219]

Zusammenfassung

Die H⁺-ATP-Synthase ist der Hauptort für die ATP-Produktion in Mitochondrien und Chloroplasten. Bisher wurde die Dimerisierung von ATP-Synthase nur in Mitochondrien beobachtet, sowohl biochemisch als auch elektronenmikroskopisch. Trotz der immer noch rätselhaften physiologischen Bedeutung wurde behauptet, dass die Dimerisierung eine einzigartige Eigenschaft des Mitochondrions ist [Biochim. Biophys. Acta 1555 (2002) 154]. Es ist schwer vorstellbar, dass die nah verwandten Proteinkomplexe von Mitochondrien und Chloroplasten solch starke Unterschiede in der strukturellen Organisation aufweisen sollen. Wir stellen die ersten Hinweise auf eine Dimerisierung der Chloroplasten-ATP-Synthase innerhalb der Thylakoidmembran vor. Durch Untersuchung der Thylakoidmembran von *Chlamydomonas reinhardtii* mittels blau-nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die Dimerisierung der Chloroplasten-ATP-Synthase detektiert. Chloroplasten-ATP-Synthase-Dimer dissoziieren in die Monomere durch Inkubation mit Vanadat oder Phosphat, aber nicht durch Inkubation mit Molybdat, während das mitochondriale Dimer nicht durch die Inkubation beeinflusst wird. Dies legt einen unterschiedlichen Dimerisierungs-Mechanismus für die Mitochondrien- und die Chloroplasten-ATP-Synthase nahe. Da Vanadat und Phosphat an die katalytisch aktive Stelle binden, werden die Kontaktstellen für das Chloroplasten-ATP-Synthase-Dimer im hydrophilen CF₁-Teil vermutet. Weil sich das Ausmaß der Dimerisierung mit der Phosphatkonzentration ändert, kann die Dimerisierung eine Reaktion auf niedrige Phosphatkonzentrationen sein.

A.9 „Respirasom“-ähnliche Superkomplexe in den Mitochondrien von Spinatblättern

“Respirasome”-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach

F. Krause, N.H. Reifschneider, D. Vocke, H. Seelert, S. Rexroth, und N.A. Dencher

J. Biol. Chem. 279 (2004) 48369-48375

Literaturstelle im vorangehenden Text: [85]

Zusammenfassung

Die Mitochondrien höherer Pflanzen besitzen viele einzigartige Eigenschaften gegenüber ihren Gegenstücken aus Tieren. Dies ist größtenteils mit der engen funktionellen wechselseitigen Abhängigkeit von Mitochondrien und Chloroplasten verbunden, bei der zwei ATP-generierende Prozesse stattfinden, die Oxidative Phosphorylierung bzw. Photosynthese. Bei zwei verschiedenen Pufferbedingungen wurden Mitochondrien aus grünen Blättern des Spinats (*Spinacia oleracea*), die mit Chloroplasten verunreinigt sind, zur Solubilisierung von Superkomplexen der Oxidativen Phosphorylierung mit Digitonin inkubiert. Wir zeigen, dass diese Digitonin-Behandlung selektiv mitochondriale Membranproteinkomplexe extrahiert und nur geringe Mengen an stromalen Thylakoidmembranproteinen. Die Digitonin-Extrakte von teilweise gereinigten Mitochondrien aus grünen Blättern des Spinats wurden mit blau- und farblos-nativer Elektrophorese analysiert. Dadurch konnten wir zum ersten Mal nachweisen, dass im Gewebe grüner Pflanzen ein substanzieller Anteil des Atmungskettenkomplexes IV mit den Komplexen I und III in „Respirasom“-ähnliche Superkomplexe assembliert ist, was zuvor nur in Säugetieren, Pilzen und nicht-grünen Pflanzenmitochondrien beobachtet worden war. Somit sind die grundlegenden Eigenschaften der supramolekularen Organisation der Standard-Atmungsketten-Komplexe I, III und IV als Respirasom in allen höheren Eukaryonten konserviert. Da die pflanzliche Atmungskette hochverzweigt ist, mit zusätzlichen alternativen Enzymen, werden die funktionellen Implikationen des Vorhandenseins von Atmungsketten-Superkomplexen in Pflanzenmitochondrien diskutiert.

A.10 Architektur aktiver Atmungsketten-Superkomplexe aus Säugetieren

Architecture of Active Mammalian Respiratory Chain Supercomplexes

E. Schäfer, H. Seelert, N.H. Reifschneider, F. Krause, N.A. Dencher und J. Vonck

J. Biol. Chem. 281 (2006) 15370-15375

Literaturstelle im vorangehenden Text: [514]

Zusammenfassung

In der inneren mitochondrialen Membran generieren die Atmungskettenkomplexe einen elektrochemischen Protonengradienten, der genutzt wird um das meiste des zellulären ATP zu synthetisieren. Gemäß einer steigenden Zahl biochemischer Studien sind diese Komplexe in Superkomplexe assembliert. Allerdings ist wenig über die Architektur dieser Strukturen bekannt. Hier beschreiben wir die elektronenmikroskopische Charakterisierung der zwei Atmungsketten-Superkomplexe I_1III_2 und $I_1III_2IV_1$ aus Rinderherzmitochondrien, welche auch die beiden vorherrschenden Superkomplexe humaner Mitochondrien sind. Nach Reinigung und Nachweis der enzymatischen Aktivität wurde ihre Struktur in Projektion durch Einzelpartikel-Bildanalyse ermittelt. Eine Differenzkarte zwischen den Superkomplexen I_1III_2 und $I_1III_2IV_1$ passt sehr genau mit der Röntgen-Struktur des Monomers von Komplex IV und zeigt auch dessen Lage in der Gesamtstruktur. Durch Vergleich unterschiedlicher Ansichten des Superkomplexes $I_1III_2IV_1$ werden die Position und gegenseitige Anordnung des Komplexes I und des Dimers von Komplex III diskutiert. Die detaillierte Kenntnis der Architektur aktiver Superkomplexe ist eine wichtige Voraussetzung für ein tieferes Verständnis der Energieumwandlung in Säuger-Mitochondrien.

A.11 Biophysik und Bioinformatik offenbaren strukturelle Unterschiede der zwei Untereinheiten des peripheren Stiels der Chloroplasten-ATP-Synthase

Biophysics and Bioinformatics Reveal Structural Differences of the Two Peripheral Stalk Subunits in Chloroplast ATP Synthase

A. Poetsch, R. J. Berzborn, J. Heberle, T. A. Link, N. A. Dencher und H. Seelert
J. Biochem. 141 (2007) 411-420

Literaturstelle im vorangehenden Text: [449]

Zusammenfassung

ATP-Synthasen wandeln einen elektrochemischen Protonengradienten in eine Rotationsbewegung des zentralen Stiels um, um die ubiquitäre Energiewährung ATP zu produzieren. Durch das Drehmoment entsteht eine Zugspannung, die durch den Stator kompensiert wird. Hierzu verbindet ein peripherer Stiel flexibel den hydrophilen katalytischen F_1 -Teil mit dem membranintegralen Protonen-transportierenden F_0 -Teil der ATP-Synthase. Während in Eubakterien ein Homodimer von b-Untereinheiten den peripheren Stiel bildet, besitzen Pflanzen-Chloroplasten und Cyanobakterien ein Heterodimer der Untereinheiten I und II. Um die funktionellen und strukturellen Konsequenzen dieser einzigartigen Eigenschaft der photosynthetischen ATP-Synthasen besser verstehen zu können, wurde eine Methode zur Reinigung der Untereinheit I aus Spinat-Chloroplasten entwickelt. Die Sekundärstruktur von Untereinheit I, die nicht zu bakteriellen b-Untereinheiten homolog ist, wurde mit der heterolog exprimierten Untereinheit II durch CD- und FTIR-Spektroskopie verglichen. Der α -Helix-Anteil betrug gemäß der CD-Spektroskopie 67% für Untereinheit I und 41% für Untereinheit II. Zusätzlich wurde die Bioinformatik eingesetzt, um die Sekundärstruktur vorherzusagen und mögliche „coiled-coil“-Bereiche zu lokalisieren. Drei helikale Bereiche wurden für Untereinheit I vorhergesagt, aber nur zwei ununterbrochene Domänen für die kürzere Untereinheit II. Die vorhergesagte Länge der „coiled-coil“-Bereiche variierte zwischen verschiedenen Spezies und den Untereinheiten I und II.

A.12 Wechselwirkungen der Rotor-Untereinheiten in der Chloroplasten-ATP-Synthase moduliert durch Nukleotide und durch Mg^{2+}

Interactions of rotor subunits in the chloroplast ATP synthase modulated by nucleotides and by Mg^{2+}

M. Gertz, H. Seelert, N. A. Dencher und A. Poetsch
Biochim. Biophys. Acta 1774 (2007) 566-574

Literaturstelle im vorangehenden Text: [450]

Zusammenfassung

ATP-Synthasen – rotierende Nanomaschinen – bestehen aus zwei Hauptteilen, F_1 und F_0 , die durch zwei Stiele verbunden werden: den zentralen und den peripheren Stiel. In Spinat-Chloroplasten bildet der zentrale Stiel (Untereinheiten γ, ϵ) mit dem Zylinder der Untereinheiten III den Rotor und vermittelt die protonenmotorische Kraft von F_0 zu F_1 , wodurch Konformationsänderungen der katalytischen Zentren in F_1 induziert werden. Die ϵ -Untereinheit ist ein wichtiger Regulator und beeinflusst benachbarte Untereinheiten ebenso wie die Aktivität des Gesamtkomplexes. Durch eine Kombination aus chemischer Quervernetzung und Massenspektrometrie haben wir die Wechselwirkungen von Untereinheit ϵ der Spinat-Chloroplasten-ATP-Synthase mit III und γ untersucht. Nach Identifizierung der interagierenden Reste in den Untereinheiten ϵ und III definierte eine Verbindung den Abstand zwischen ϵ -Cys6 und III-Lys48 von mindestens 9,4 Å. In Konkurrenz dazu wurde ϵ -Cys6 mit Untereinheit γ quervernetzt. Veränderte Ausbeuten der Vernetzung zeigten den Einfluss von Nukleotiden und von Mg^{2+} auf die Quervernetzung von Untereinheit ϵ . Die Anwesenheit von Nukleotiden induzierte offensichtlich eine Verlagerung des N-Terminus von Untereinheit ϵ , durch die ϵ -Cys6 sowohl von III-Lys48 als auch von Untereinheit γ getrennt wurde, und sich somit die Quervernetzungsausbeute der Untereinheiten ϵ und γ sowie ϵ und III verringerte. Allerdings führten steigende Konzentrationen des Kofaktors Mg^{2+} zu einer bevorzugten Quervernetzung von ϵ -Cys6 mit Untereinheit γ anstelle von III-Lys48, und weisen so auf eine Annäherung der Untereinheiten ϵ und γ und Abtrennung von III-Lys48 hin.

A.13 Der Metabolismus reguliert die Dimerisierung der Chloroplasten- F_0F_1 -ATP-Synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*

Metabolism controls dimerization of the chloroplast F_0F_1 ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*

H.J. Schwaßmann, S. Rexroth, H. Seelert und N. A. Dencher
FEBS Lett. 581 (2007) 1391-1396

Literaturstelle im vorangehenden Text: [502]

Zusammenfassung

Dimere und Oligomere von F-Typ ATP-Synthasen wurden zuvor in den Mitochondrien verschiedener Organismen und für die CF_0F_1 -ATP-Synthase in den Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii* beobachtet. Im Gegensatz zu den Mitochondrien dissoziieren die Dimere der Chloroplasten-ATP-Synthase allerdings bei erhöhten Phosphat-Konzentrationen. Dies legt eine Regulation der Dimerisierung durch physiologische Prozesse in der Zelle nahe. Die Markierung mit stabilen Isotopen an lebenden Zellen und blau-native Elektrophorese wurden zur Quantifizierung der Unterschiede im Verhältnis von monomerer zu dimerer CF_0F_1 -ATP-Synthase eingesetzt. *Chlamydomonas-reinhardtii*-Zellen wurden photoautotroph in Anwesenheit von ^{15}N kultiviert und photomixotroph bei natürlicher ^{14}N -Isotopenhäufigkeit. Im Vergleich zur photoautotrophen Anzucht wurde ein erhöhter Zusammenbau von ATP-Synthase-Dimeren auf Kosten der vorher vorhandenen Monomere während des photomixotrophen Wachstums beobachtet, was eine metabolische Steuerung des Dimerisierungsprozesses zeigt.

A.14 Detektion und Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen im Proteom von Organellen und Prokaryonten durch blau-native und farblos-native Elektrophorese

Detection and Analysis of Protein-Protein Interactions of Organellar and Prokaryotic Proteomes by Blue Native and Colorless Native Gel Electrophoresis

F. Krause und H. Seelert

in *Current Protocols in Protein Science* (Hrsg.: Coligan, J. E., Dunn, B. M., Speicher, D. W. und Wingfield, P. T.) John Wiley and Sons, Inc., Supplement 51 (2008) UNIT 14.11: 1-36; wiederveröffentlicht als UNIT 19.18.

Literaturstelle im vorangehenden Text: [392]

Zusammenfassung

Native Gele ermöglichen die Analyse von Proteinkomplexen im Proteom-Maßstab bei einem einzigen Experiment. Die Vorschriften in diesem Abschnitt basieren auf der Trennung von Proteinkomplexen durch blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE), dem vielfältigsten nativen Gelsystem, und der nahe verwandten milderen farblos-nativen PAGE (CN-PAGE). Beide, BN-PAGE und CN-PAGE, sind im analytischen bis präparativen Maßstab beschrieben. Zusätzlich sind Methoden zur nachfolgenden Analyse von Proteinkomplexen aufgeführt, inklusive der Elektroelution aus nativen Gelen, sowie der denaturierenden und nativen zweidimensionalen PAGE. Schließlich wird die Entfernung des Coomassie-Farbstoffs von den elektroeluierten Proteinen beschrieben. Zum Abschluss sind grundsätzliche Überlegungen zur Solubilisierung von Membranproteinkomplexen aus unterschiedlichen biologischen Proben diskutiert, am Beispiel von Mitochondrien, Chloroplasten (Thylakoiden) und Cyanobakterien.

A.15 Bemerkenswerte Stabilität der Protonen-translozierenden F_1F_0 -ATP-Synthase aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

Remarkable stability of the proton translocating F_1F_0 -ATP synthase from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

T. Suhai, N. A. Dencher, A. Poetsch und H. Seelert
Biochim. Biophys. Acta 1778 (2008) 1131-1140

Literaturstelle im vorangehenden Text: [428]

Zusammenfassung

Zur funktionellen Charakterisierung haben wir die F_1F_0 -ATP-Synthase aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* isoliert. Durch die hohen Mengen an Phycobilisomen war eine Kombination der Farbstoffliganden- mit der Anionenaustausch-Chromatographie erforderlich um hoch-reine ATP-Synthase zu erhalten. Alle neun einzelnen F_1F_0 -Untereinheiten wurden durch Massenspektrometrie nachgewiesen. Durch Western-Blotting wurde das SDS-stabile Oligomer der Untereinheiten c in *T. elongatus* aufgedeckt. Im Gegensatz zur Massenangabe aus der Datenbank (10.141 Da) ergab die MALDI-TOF-MS eine Masse für das Monomer der Untereinheit c von nur 8238 Da. Eine bemerkenswerte Eigenschaft der ATP-Synthase war ihre Fähigkeit, über einen großen Temperaturbereich ATP zu synthetisieren und ihre Stabilität gegenüber chaotropen Reagenzien. Nach Rekonstitution von F_1F_0 in Liposomen zeigt die ATP-Synthese-Aktivität angetrieben durch einen künstlichen elektrochemischen Protonengradienten die funktionelle Integrität. Die höchste ATP-Synthese-Geschwindigkeit wurde bei der natürlichen Wachstumstemperatur von 55°C gemessen, aber sogar bei 95°C fand ATP-Produktion statt. Im Gegensatz zu anderen prokaryontischen und eukaryontischen ATP-Synthasen, welche durch den Coomassie-Farbstoff in den membranintegralen und hydrophilen Teil zerlegt werden können, besaß die F_1F_0 -ATP-Synthase eine außergewöhnliche Stabilität. Auch mit den chaotropen Reagenzien Natriumbromid und Guanidiniumthiocyanat waren deutlich rauere Bedingungen zur Disassemblierung der thermophilen ATP-Synthase erforderlich.

A.16 Präparative Isolierung von Proteinkomplexen und anderen Biomolekülen durch Elution aus Polyacrylamidgelen

Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels

H. Seelert und F. Krause

Electrophoresis 29 (2008) 2617-2636

Literaturstelle im vorangehenden Text: [132]

Zusammenfassung

Aufgrund ihrer unerreichten Trennschärfe ist die Gelelektrophorese ein unverzichtbares Werkzeug zur Analyse diverser Biomoleküle. Durch Anpassen der elektrophoretischen Bedingungen wandern sogar fragile Proteinkomplexe, die Bestandteile intrazellulärer Netzwerke, durch die Gelmatrix unter Erhaltung ihrer Integrität. Wenn die Dicke von solchen nativen Gelen gegenüber der analytischen Variante deutlich erhöht wird, können auch hohe Probenmengen verarbeitet werden. Allerdings beeinträchtigt das käfigartige Netzwerk eine tiefergehende Entschlüsselung der Struktur und Funktion von Proteinkomplexen und anderen Teilchen. Als Konsequenz sollten die Biomoleküle also aus der Matrix in die Lösung hinein entfernt werden. Mehrere Vorgehensweisen, um an dieses Problem heranzugehen, sind in diesem Übersichtsartikel zusammengefasst. Während sich die passive Elution auf Diffusionsprozesse stützt, verwendet die Elektroelution ein elektrisches Feld, um die Biomoleküle aus dem Gel heraus zu drängen. Bei der kontinuierlichen Elution wird direkt für die Elektrophorese ein alternatives Gerät benötigt. In dieser Apparatur migrieren die Moleküle so lange im elektrischen Feld, bis sie das Gel verlassen und in einem fließenden Puffer gesammelt werden. Die erfolgreiche Isolierung diverser Proteinkomplexe, wie Photosysteme, ATP-abhängige Enzyme oder aktive Atmungsketten-Superkomplexe und einiger anderer Biomoleküle demonstriert die Vielseitigkeit der präparativen Elektrophorese. Nach Befreiung der Teilchen aus dem Gelkäfig sind zahlreiche Anwendungen möglich. Darin eingeschlossen ist die Ermittlung der einzelnen Komponenten bis hin zur hochauflösenden Strukturaufklärung von Proteinkomplexen. Daher kann die präparative Elektrophorese Standard-Reinigungsverfahren ergänzen und ist ihnen in einigen Fällen sogar überlegen.

A.17 Von Protonen zu OXPHOS-Superkomplexen und der Alzheimer-Erkrankung: Struktur-Dynamik-Funktions-Beziehung von energieumwandelnden Membranen

From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes

H. Seelert, D. N. Dani, S. Dante, T. Hauß, F. Krause, E. Schäfer, M. Frenzel, A. Poetsch, S. Rexroth, H. J. Schwaßmann, T. Suhai, J. Vonck, und N. A. Dencher
Biochim. Biophys. Acta 1787 (2009) 657-671

Literaturstelle im vorangehenden Text: [198]

Zusammenfassung

Durch hochauflösende Strukturaufklärung hat sich die Vorstellung von bioenergetischen Prozessen präzisiert. Aber trotz dieser grundlegenden Fortschritte sind viele Fragestellungen ungelöst. Wir haben eine Vielfalt von Aspekten energieumwandelnder Membranen analysiert, von großen Proteinkomplexen bis hinab zum Bereich der Protonen und der funktionsrelevanten Pikosekunden-Proteindynamik. Aufbauend auf der zentralen Rolle der ATP-Synthase bei der Bereitstellung des biologischen Kraftstoffs ATP wurde ein Schwerpunkt auf diesen Proteinkomplex gelegt, sowohl aus Chloroplasten als auch aus Mitochondrien. Insbesondere wurde die Stöchiometrie an Protonen, die zur Synthese eines ATP-Moleküls erforderlich sind, und die supramolekulare Organisation der ATP-Synthase untersucht. Da die Bildung von Superkomplexen auch andere Komplexe der Atmungskette betrifft, richtete sich unsere Arbeit auf die Entschlüsselung dieser Art der Organisation, z.B. auf den OXPHOS-Superkomplex $I_1III_2IV_1$, in Bezug auf seine Struktur und Funktion. Aber nicht nur die großen Proteinkomplexe sind die Hauptakteure der biologischen Energieumwandlung, sondern auch die kleinen Komponenten wie Chinone, die den Transfer von Elektronen und Protonen bewerkstelligen. Daher wurde ihre Position im Membranprofil durch Neutronendiffraktion ermittelt. Die physiko-chemischen Eigenschaften des Wegs der Protonen von den Erzeugern des elektrochemischen Gradienten zur ATP-Synthase, sowie ihre Wechselwirkung mit der Membranoberfläche, konnte durch zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie in Kombination mit optischen pH-Indikatoren aufgeklärt werden. Krankheiten wie die Alzheimer-Demens (AD) werden durch Störungen der Membran und der Bioenergetik ausgelöst, wie durch unsere Neutronenstreuungs-Studien gezeigt wurde.

A.18 Hochsensitive Detektion der ATPase-Aktivität in nativen Gelen

Highly sensitive detection of ATPase activity in native gels

T. Suhai, N. G. Heidrich, N. A. Dencher und H. Seelert

Electrophoresis 30 (2009) 3622-3625

Literaturstelle im vorangehenden Text: [452]

Zusammenfassung

Die native Elektrophorese ist eine leistungsfähige Methode zur Trennung intakter Proteinkomplexe. Durch Inkubieren derartiger Gele in einer geeigneten Reaktionslösung können spezifische Enzymaktivitäten umfassend untersucht werden. Die aktuelle Standardprozedur zur Bestimmung der ATP-Hydrolyse-Aktivität in blau- oder farblos-nativen Gelen basiert auf der Bildung eines Bleiphosphat-Präzipitats. Die dabei resultierenden weißen Banden stellen bei niedrigen Aktivitäten eine Herausforderung für die Detektion und Dokumentation dar. Zur Analyse photosynthetischer ATP-Synthasen ist die Methode anzupassen, um eine Aufhebung der Inhibition latenter ATPase-Funktionen zu erreichen. Daher haben wir die Inkubation der Gele in Detergens-Lösung eingeführt, wobei sich Taurodesoxycholat als effizientester Aktivator herausstellte. Für die Detektion niedriger ATPase-Aktivitäten ist ein zusätzlicher kurzer Inkubationsschritt im Anschluss an die Bildung von Bleiphosphat empfehlenswert. Durch Zugabe von Ammoniumsulfid wandeln sich die weißen Banden in bräunlich-schwarze Banden mit Bleisulfid um. Unsere neue Prozedur erhält den linearen Quantifizierungsbereich der originalen Bleiphosphat-Vorschrift, erweitert aber darüber hinaus die Detektionsgrenze.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich meine Habilitationsschrift selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, noch keinen Habilitationsversuch unternommen zu haben.

Darmstadt, den 21.06.2010